

**Die differentielle Deposition von Lamininketten in  
der Basalmembran von benignen und malignen  
epithelialen Läsionen der Mamma. Der Verlust  
von Laminin-5 als Marker der Dignitätsänderung.**

**Dissertation**

**zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor medicinae (Dr. med.)**

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich Schiller Universität Jena**

**von Dipl. Med. Kerstin Henning  
geboren am 31. Mai 1966 in Jena**

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	I
Abkürzungsverzeichnis .....	IV
1. Einleitung .....	1
1.1.    Zur Struktur und Funktion der Basalmembran .....	1
1.2.    Bedeutung der Basalmembran für Wachstum, Differen- zierung und gewebliche Stabilität in der Mamma .....	4
1.3.    Karzinomassoziierte Basalmembranirregularitäten unter Berücksichtigung des Mammakarzinoms.....	7
1.4.    Die Lamininmolekülfamilie .....	11
1.4.1.  Die Molekülstruktur von Laminin .....	11
1.4.2.  Die Neudefinition von Laminin als Molekülfamilie.....	12
1.4.3.  Aufbau und grundsätzliche Prinzipien der geweblichen Verteilung und Funktion ausgewählter Lamininisoformen .....	14
1.5.    Zielstellung .....	21
2. Material und Methoden.....	22
2.1.    Untersuchungsmaterial.....	22
2.2.    Histologische Technik .....	25
2.2.1.  Aufbewahrung des Gewebsmaterials .....	25
2.2.2.  Übersicht der applizierten Antikörper .....	25

2.2.3.	APAAP-Methode als Nachweismethode der primären Antikörper .....	26
2.2.4.	Verzeichnis der Puffer-, Farb- und Fixierungslösungen für die Immunhistochemie .....	27
2.2.5.	Bewertungskriterien der immunhistochemischen Reaktionen .	29
3.	Ergebnisse .....	31
3.1.	Immunhistochemischer Nachweis der Lamininketten im normalen adulten lobulären und duktalem Epithel der Mamma ....	31
3.2.	Verteilungsmuster der einzelnen Lamininketten in sklerosierenden Adenosen .....	33
3.3.	Verteilungsmuster der einzelnen Lamininketten in Fibroadenomen .....	35
3.4.	Verteilungsmuster der Lamininketten in benignen epithelial-proliferierenden duktalem Läsionen der Mamma .....	36
3.5.	Verteilungsmuster der Lamininketten in der epithelialen Basalmembran nicht-invasiver duktalem Mammakarzinome ....	37
3.6.	Verteilungsmuster der Lamininketten in invasiv duktalem Mammakarzinomen .....	39
3.7.	Verteilungsmuster der Lamininketten in invasiv lobulären Karzinomen der Mamma.....	45
4.	Diskussion .....	47
4.1.	Lamininketten als diagnostischer Marker .....	47
4.2.	Zur Wertigkeit des immunhistochemischen Nachweises der Lamininketten-Charakterisierung des Bindungsverhaltens der monoklonalen Antikörper gegen die einzelnen Lamininketten.	47
4.2.1.	Bindungsverhalten der eingesetzten Antikörper 4E10 und 2E8 gegen die Laminin $\beta$ 1- und $\gamma$ 1- Ketten.....	49

---

4.2.2.	Bindungsverhalten des monoklonalen Antikörpers 5H2 gegen die $\alpha$ 2-Kette und des Antikörpers C4 gegen die $\beta$ 2-Kette .....	49
4.2.3.	Bindungsverhalten des monoklonalen Antikörpers BM165 gegen die Laminin $\alpha$ 3-Kette .....	49
4.2.4.	Bindungsverhalten des eingesetzten Antikörpers 4C7 gegen die $\alpha$ 5-Kette .....	50
4.2.5.	Bindungsverhalten des monoklonalen Antikörpers GB3 gegen die Lamininkette $\gamma$ 2 .....	50
4.3.	Korrelation der Lamininkettendeposition in der normalen adulten Mamma im Vergleich zu anderen drüsig differenzierten epithelialen Strukturen .....	51
4.4.	Demonstration der Deposition der $\beta$ 2-Kette in benignen und malignen epithelialen Läsionen der Mamma im Prozess der Proliferation und Dignitätsänderung .....	56
4.5.	Der Laminin-5 Kettenverlust – ein Indikator der Malignität in Mammaläsionen .....	56
4.5.1.	Laminin-5 als Teil des epithelialen Adhäsionskomplexes .....	56
4.5.2.	Die funktionelle Bedeutung des epithelialen Adhäsionskomplexes unter besonderer Berücksichtigung von Laminin-5 für die Morphogenese und Karzinogenese der Mamma .....	58
4.5.3.	Einordnung der differenten Laminin-5 Kettenexpression in den verschiedenen Tumorentitäten .....	60
4.5.4.	Laminin-5 als Marker der Dignitätsbestimmung in epithelialen Mammaläsionen .....	65
5.	Zusammenfassung .....	67
6.	Literatur.....	69

---



### Abkürzungsverzeichnis

Aqua dest. Aqua destillata, destilliertes Wasser

EHS Engelbreth-Holm-Swarm

HE Hämalan-Eosin

PBS phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)

TBS Tris buffered saline (Tris- gepufferte Kochsalzlösung)

Tris 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol

WHO World Health Organisation

## 1. EINLEITUNG

### 1.1. Zur Struktur und Funktion der Basalmembran

Die Basalmembran ist eine spezielle Organisationsform der extrazellulären Matrix, die Epithelzellen vom Stroma trennt, aber auch dort auftritt, wo Plasmamembranen parenchymal-mesenchymaler Zellen auf Bindegewebe treffen. Sie stellt eine Trenn- und Verknüpfungsstruktur dar, da sie neben der Kompartimentierungsfunktion auch als Verankerungsareal für die Epithelzellen dient und über spezielle Rezeptoren die Zelldifferenzierung und Zellproliferation beeinflusst (Merker 1994).

Weiterhin dient sie als Substrat für die Zelladhäsion, wodurch Polarisierung und Migration von Zellen ermöglicht werden (Ekblom 1993), und beeinflusst die Morphogenese epithelialer Gewebe (Streuli et al. 1991). Henderson und Copp (1997) untersuchten den Einfluss der Matrix auf die Migration von Neuralleistenzellen und stellten fest, dass dies durch Bereitstellung permissiver oder nichtpermissiver Substrate erfolgt. Proteine wie Fibronektin, Laminin und verschiedene Kollagenisoformen üben einen unterstützenden Einfluss auf Zellmigration und -ausbreitung aus, während nichtpermissive Eiweiße (Chondroitinsulfat-Proteoglykane) diesen Prozess verhindern.

Außerdem reguliert die Basalmembran den transmembranösen Substratfluss größen- und ladungsselektiv und dient als Depot für wichtige Transmittersubstanzen, wie zum Beispiel den „basic fibroblast growth factor“ (bFGF) und eine Vielzahl weiterer Wachstums- und Differenzierungsfaktoren (Ashkens et al. 1996). Die Betrachtung der extrazellulären Matrix selbst als strukturgebender Wachstumsfaktor ergibt sich zum Beispiel durch den Nachweis des wiederholten Auftretens wachstumsfaktorähnlicher Peptidsequenzen (EGF-like sequences) innerhalb dieser (Engel 1989).

Die Basalmembran ist für die Aufrechterhaltung des histologischen Bau-

musters unabdingbar, wobei die Resistenz gegenüber degradierenden Enzymen von Bedeutung ist. Auch für den Prozess der Wundheilung und der Regeneration sind die strukturbestimmenden Eigenschaften unerlässlich.

In zahlreichen immunhistochemischen Untersuchungen wurde aufgezeigt, dass Basalmembranen in Abhängigkeit von ihrer Lokalisation eine differente qualitative und quantitative Zusammensetzung aufweisen (Nerlich 1995).

Der Begriff "Basalmembran" wurde lichtmikroskopisch geprägt, darunter wurde zunächst eine amorphe strukturlose membranöse Grenzstruktur zwischen differenziertem Gewebe (z.B. basale Schicht von Epithelzellen) und umgebendem Bindegewebe verstanden (Flug und Köpf-Maier 1995). Auf Grund ihrer Dicke von 0,05 Mikrometer waren aber detaillierte Aussagen bezüglich ihrer Struktur mittels lichtmikroskopischer Routinefärbungen nicht möglich. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten die Basalmembran als dichte Ablagerung eines feingranulären bis -fibrillären Materials mit Schichtungsstruktur auf, wobei sich eine ca. 50 bis 100 nm dicke Basallamina und eine Lamina reticularis (Martinez-Hernandez et al. 1983) fanden. Letztere "verankert" die Basallamina im angrenzenden Stroma mittels Ankerfibrillen, elastischen Mikrofibrillen und zarten interstitiellen Fibrillen (Inoue und Leblond 1988, Inoue 1994).

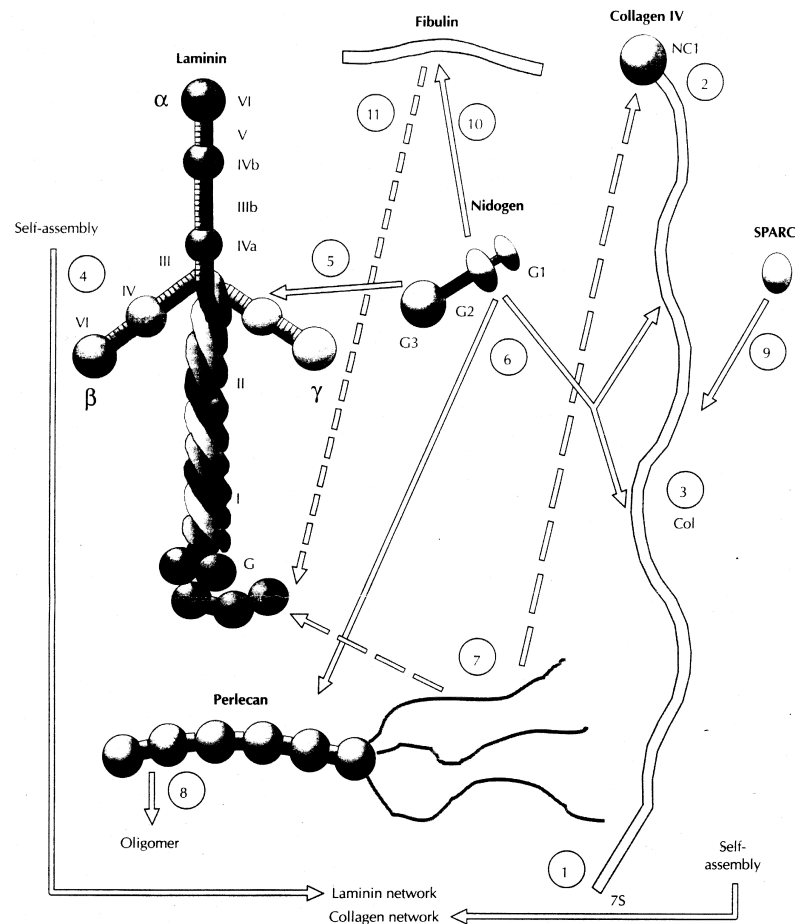
Ultrastrukturell besteht die Basallamina aus der elektronendurchlässigen Lamina rara (Lamina lucida), die der Zellmembran der Epithelzelle zugewandt ist, und der elektronendichten Lamina densa (Martinez-Hernandez et al. 1983). Die Lamina lucida ist nicht klar abgegrenzt, was durch die in Form eines Netzwerkes angrenzende Lamina densa bedingt ist, der eine klare Demarkation fehlt. Die Übergangszone in das angrenzende Stroma erfolgt durch die unterschiedlich breite Pars fibroreticularis (Abrahamson 1986).

Zwei Matrixmolekülgruppen bestimmen die Zusammensetzung der Basalmembran: dies sind zum einen die Proteoglykane, die die wasserhaltige Grundsubstanz bilden (Grundlage für die Diffusion von Nährstoffen, Metaboliten, Zytokinen), in die andererseits die so genannten Faserproteine eingebettet sind. Die Faserproteine umfassen neben Strukturproteinen wie Kollagen und Elastin auch Anheftungsproteine, zu denen z.B. Laminin als Bestandteil

der Basalmembran sowie Tenascin und Fibronectin als interstitielle Glykoproteine zählen (Timpl 1989).

Die am weitesten verbreitete spezifische Basalmembrankomponente ist Kollagen Typ IV, auf Grund seines Vorkommens ausschließlich in Basalmembranen und seiner Präsenz in allen Basalmembranen kann Kollagen IV zur immunhistochemischen Definition von Basalmembranen verwendet werden. Zu Kollagen-Typ-IV liegen umfangreiche Untersuchungen vor, es gelang der Nachweis verschiedener Isoformen (Butkowski et al. 1989). "Klassisches" Kollagen-Typ IV besteht aus zwei verschiedenen Polypeptidketten ( $\alpha 1$  und  $\alpha 2$ ), welche eine Tripelhelix formieren (Paulson 1992). Die Kollagenmoleküle sind durch die Domänen zu Tetrameren aggregiert und bilden ein dreidimensionales Netzwerk, welches Bindungsstellen für andere Makromoleküle aufweist. Kollagen Typ IV gewährleistet die strukturelle Stabilität innerhalb der Basalmembran, bildet sozusagen ihr Gerüst.

Die Verbindung des Kollagen Typ IV-Netzwerkes zum Lamininnetzwerk wird über Nidogen/Entactin vermittelt. (Yurcheno et ORear 1994, Abbildung 1) Daneben existieren weitere Basalmembran-typische Proteine wie Heparansulfatproteoglykane, Perlecan, Kollagen Typ XVIII und Agrin (Timpl und Brown 1994).



**Abbildung 1: Darstellung der Proteininteraktionen in der Basalmembran nach Yurchenco und ORear 1994**

## 1.2. Bedeutung der Basalmembran für Wachstum, Differenzierung und gewebliche Stabilität in der Mamma

Zwischen der Komposition der extrazellulären Matrix sowie Zellwachstum, -proliferation und -differenzierung besteht ein Wechselverhältnis, wobei der Organisationsform der extrazellulären Matrix als Basalmembran eine besondere Bedeutung beigemessen werden kann (Adams und Watt 1993).

Zum einen produzieren die Zellen eine ihrem Entwicklungs- und Funktionszustand entsprechende Basalmembran. Dabei unterscheiden sich die strukturellen Eigenschaften der Basalmembran in den verschiedenen Entwicklungs- und Funktionszuständen der Mamma (z.B. jugendliche Mamma, Schwangerschaft, Laktation und Involution) (Lochter und Bissell 1995).

Zum anderen sind die Basalmembrankomponenten fähig, Zelleigenschaften wie Differenzierung und Proliferation der Zellen zu beeinflussen (Bissell et al. 1989; Adams und Watt 1993).

In der Literatur sind zahlreiche experimentelle Untersuchungsergebnisse zur Bedeutung der extrazellulären Matrix für den Prozess der Differenzierung und Proliferation verfügbar (Blum et al. 1989; Damjanov 1990).

Werden zum Beispiel humane Mammaepithelzelllinien ohne vorbestehende extrazelluläre Matrix kultiviert, proliferieren sie in Form wenig polarisierter Monolayer-Strukturen. Werden sie hingegen in einem Kulturmedium angezüchtet, welches Basalmembranbestandteile des Engelbreth-Holm-Swarm-Tumor enthält, formieren sie Zellkolonien in Form von verzweigenden Tubuli (Darcy et al. 1991, Berdichevsky et al. 1992, Bergstraesser et al. 1993). Diese alveolar- und gangähnlichen Strukturen zeigen Merkmale typisch polarisierter Epithelien wie die basolaterale Distribution der Cadherine und Integrine, die apikale Expression von Sialomucin und die Deposition von Basalmembranproteinen (Streuli und Bissell 1990; Petersen et al. 1992).

Auch den direkten Einfluss von Basalmembranbestandteilen auf die Expression von  $\beta$ -Casein konnten Streuli und Mitarbeiter nachweisen: Separierte Brustdrüsenepithelien der Maus wurden, nachdem sie an Plastikplatten kultiviert wurden und ihre Fähigkeit zur Milchproteinsynthese verloren hatten, zur Genreexpression mittels einer lamininreichen Basalmembranmatrix befähigt (Streuli et al. 1991).

Um den Einfluss der extrazellulären Matrix auf die Milchproteinexpression zu untersuchen, nutzten Wicha und Mitarbeiter eine azelluläre Biomatrix, die aus der Brustdrüse schwangerer Ratten gewonnen wurde als Substrat für die Anzucht von Epithelzellen und wiesen die  $\alpha$ -Lactoalbuminproteinsynthese nach (Wicha et al. 1982).

Eine koordinierte Expression und ein bestimmtes Verhältnis zwischen matrixabbauenden Proteinasen und deren Inhibitoren bestimmt die epitheliale Zellfunktion und -morphologie während der Involution der Mamma (Talhouk et al. 1991). Erhöht sich der Anteil degradierender Proteinasen, verlieren die Brustdrüsenepithelien ihre Fähigkeit zur  $\beta$ -Caseinexpression und unterliegen

dem Prozess der Apoptose und Regression. Werb und Mitarbeiter (Werb et al. 1996) zeigten auf, dass in der Brustdrüse der Maus nach Beendigung der Laktation noch ein bis zwei Tage eine Milchsekretion und -akkumulation in den Alveolarlumina nachweisbar ist. Während dieser Zeit werden durch die Epithelzellen selbst oder myoepitheliale Zellen bzw. Fibroblasten des benachbarten Stroma matrixabbauende Substanzen sezerniert mit der Folge gestörter Interaktionen zwischen Basalmembran und Epithel sowie innerhalb des Epithelzellverbandes (Boudreau et al. 1995).

Eine zentrale Rolle nehmen in diesem Prozess die Metalloproteinasen sowie deren Inhibitoren ein (Thomasset et. al 1998). Kurz nach Beendigung der Laktation wiesen die Gewebsinhibitoren der Metalloproteinasen eine maximale Expression auf, wobei gleichzeitig eine beginnende Stromelysinproduktion nachweisbar war (Werb et al. 1996). In den Folgetagen kam es zu einer stetigen Zunahme der Proteinasen bei gleichzeitiger Abnahme bis zum völligen Verlust ihrer Inhibitoren. Dieser Prozess könnte über die Induktion der Genexpression des Interleukin-1 $\beta$ -konvertierenden Enzyms die Apoptose in Gang setzen. Nach der Eliminierung der apoptotischen Zellen aus dem Verband konstituieren sich die verbleibenden Epithelien an der Basalmembran, im Ergebnis der Involution liegt ein kleinerer Alveolus mit intakter Basalmembran vor (Lefebvre et al. 1992).

Um den Involutionsmodus der Brustdrüse experimentell zu charakterisieren, nutzten Wicha und Mitarbeiter Cishydroxyprolin, welches die Kollagen IV-Deposition in der Brustdrüse der Ratte inhibiert (Wicha et al. 1980). Eine Tumorinvolution von induzierten Mammakarzinomen in der Ratte konnte ebenfalls durch den Einsatz von Cishydroxyprolin erreicht werden. Die Autoren schlussfolgerten daraus die Notwendigkeit einer intakten Basalmembran sowohl für die Aufrechterhaltung der strukturellen Integrität der normalen Brustdrüse als auch für das Wachstum karzinomatösen Epithels.

Die Synthese und Deposition von Basalmembranbestandteilen wird durch das Brustdrüsenepithel selbst beeinflusst. So erfolgt der Einbau von Glykosaminoglykanen in die Basalmembran verstärkt, wenn die Drüsenepithelzellen in einem Kollagengel kultiviert werden (Parry et al. 1985).

### **1.3. Karzinomassoziierte Basalmembranirregularitäten unter Berücksichtigung des Mammakarzinoms**

Das invasive Wachstum von Karzinomzellen ist ein komplexer Prozess, der durch zahlreiche spezifische Wechselwirkungen zwischen Tumorzelle und angrenzender Basalmembran bzw. umgebendem Tumorstroma charakterisiert ist (Roos et al. 1984).

Epitheliale Basalmembranen gelten als eine mechanische Barriere für die Invasion (Bosman 1994), da sie normalerweise die Passage von Zellen verhindern (Timpl und Dziadek 1986). Die Überwindung der Basalmembran erfordert einen koordinierten Prozess.

Liotta und Mitarbeiter (Liotta et al. 1983) postulierten einen aus drei Einzelschritten bestehenden Invasionsmodus von Karzinomzellen. Nachdem das „attachment“ der Tumorzellen an die Basalmembran über Integrinrezeptoren vermittelt wird (Albeda et al. 1990), sezernieren die Karzinomzellen degradierende Enzyme, was eine lokalisierte Lyse der Basalmembran zur Folge hat. Enzyme mit positiver Assoziation zur Tumoraggression sind zum Beispiel die Matrix-Metalloproteasen (Stetler-Stevenson 1996). Hier wäre beispielshalber auf Stromelysin, mit der Fähigkeit, Laminin abzubauen und die Typ-IV-Kollagenase hinzuweisen. Die Wirkung dieser Enzyme hilft den Tumorzellen, das Stroma zu erreichen (Stetler-Stevenson et al. 1993). In der Region der Matrixproteolyse setzt der Prozess der Tumorzelllokomotion ein. Die Tumorzellbeweglichkeit wird dabei durch Zytokine reguliert und durch chemisch anziehende Stoffe im Stroma beeinflusst.

Im Bereich der Invasion wird die Basalmembran umschrieben ab- und umgebaut. Die Tumorzellen gelangen somit in das Stroma. Als ursächlich für die Basalmembranabbrüche beziehungsweise die verminderte Basalmembranposition im Tumor sind neben dem gesteigerten Abbau durch Proteasen auch gestörte Syntheseleistungen (Liotta et al. 1984) sowie die Unfähigkeit des Tumors, die Matrixproteine in einer geordneten Basalmembran zu konstituieren (Noel et al. 1993), anzusehen. Der mindestens herdförmige Verlust der



Basalmembran wurde deshalb als frühestes morphologisches Kriterium einer Stromainvasion gewertet (Barsky et al. 1983). In den Folgejahren wurden zahlreiche maligne und benigne Tumorentitäten bezüglich qualitativer und quantitativer Strukturveränderungen der epithelialen Basalmembran untersucht, wobei neben Defekten und Verlusten verschiedener Basalmembranproteine in benignen Läsionen (Köpf-Maier und Merker 1991; Farnoud 1994) eine gesteigerte Synthese von Matrixmolekülen insbesondere in der Invasionsfront von Karzinomen nachzuweisen (Pyke et al. 1994) war. Diese Untersuchungsergebnisse stehen in Übereinstimmung zur Beobachtung invasionsassoziiierter Basalmembranverdickungen, -versmälnerungen, Fragmentierungen, Verdopplungen und Verlusten sowie der Deposition von Basalmembranbestandteilen außerhalb der regulären Basalmembran in Karzinomen (Ghadially 1997). Da einerseits Karzinomzellen prinzipiell zur Synthese von Basalmembranproteinen befähigt sind und Basalmembrandefekte in nicht-neoplastischen Läsionen beschrieben wurden als auch dem gegenüberstehend nichtinvasive dysplastische Epithelveränderungen mit Basalmembrandefekten einhergehen können, darf der Nachweis eines fokalen Basalmembranverlustes in den verschiedenen Tumorentitäten nicht in jedem Falle mit einem invasiven Wuchsverhalten gleichgesetzt werden (Nerlich 1998).

Aus dem Schrifttum ist zu entnehmen, dass quantitative und qualitative Änderungen der Basalmembranproteinablagerung von Bedeutung für die Differenzierung eines malignen Tumors und die Prognose des Geschwulstleidens sein können. So korrelierten Havenith und Mitarbeiter die Deposition von Basalmembranbestandteilen im Kolonkarzinom zur Tumordifferenzierung (Havenith et al. 1988). Auch für das Transitionalzellkarzinom der Harnblase und das Plattenepithelkarzinom der Lunge ist die Ablagerung von Matrixproteinbestandteilen im Tumorbereich als günstiger Prognosefaktor herausgestellt worden (Schapers et al. 1990, Ten Velde et al. 1991). Dazu differente Untersuchungsergebnisse bezüglich der prognostischen Bedeutung der Basalmembran deposition erzielten Noel und Mitarbeiter, die Zellen des sehr basalmembranreichen Engelbreth-Holm-Swarm-Tumors subkutan in Mäuse injizierten. Neben einem raschen Tumorwachstum kam es innerhalb einiger Wochen

auch zur Ausbildung von Lungenmetastasen und zum Tod der Tiere (Noel et al. 1993).

Bezüglich der Basalmembranveränderungen ist das Mammakarzinom ausführlicher untersucht worden als viele andere Tumorentitäten.

Einheitliche Meinungen existieren über die Integrität und Zusammensetzung der epithelialen Basalmembran der adulten normalen Mamma. Immunhistologische Untersuchungen wiesen stets kontinuierliche Farbreaktionen bei Einsatz von Antikörpern gegen die Basalmembrankomponenten Laminin und Kollagen IV nach (Wetzels et al. 1989, Barsky et al. 1983, Gould et al. 1990, Böcker et al. 1992 Teil I).

Auch benigne epitheliale Läsionen wiesen kontinuierliche Basalmembranen im Grenzbereich zum umgebenden Stroma auf (Willebrand et al. 1986; Böcker et al. 1992 Teil I; Guelstein et al. 1993).

Mammakarzinome zeigten zum Teil in Abhängigkeit von der Differenzierung und dem histologischen Bautyp in ihren invasiven Abschnitten einen überwiegend kompletten, teilweise auch inkompletten Verlust der epithelialen Basalmembran mit meist nur herdförmigen Basalmembranresten (Albrechtsen et al. 1981; Gusterson et al. 1982, Birembaut et al. 1983, Sakr et al. 1988, Nerlich 1995). Ein höherer Differenzierungsgrad des Karzinoms korrelierte zu einem quantitativ stärkeren Lamininnachweis in Umgebung der Tumorzellkomplexe (Charpin et al. 1986, Arihiro et al. 1993).

Auch Barsky und Mitarbeiter zeigten grundlegende Strukturstörungen bezüglich Verteilung und Kontinuität der epithelialen Basalmembran bei Karzinomen im Vergleich zu benignen Erkrankungen auf (Barsky et al. 1983). Grundsätzliche Unterschiede zwischen normalen Brustdrüsenepithelien und malignen epithelialen Zellen bezüglich des Differenzierungs- und Wachsmusters konnten auch in Zellkulturen gefunden werden: während normale epitheliale Zelllinien in Kolonien ähnlich denen normaler Azini mit zentraler Lumenbildung unter Nachweis einer kontinuierlichen endogen produzierten Basallamina in Form von Kollagen-IV proliferierten, zeigten nur einzelne Karzinomzelllinien fragmentarisch einen Kollagen-IV Nachweis. Die Tumorzellkolonien waren außerdem durch höhere Zellzahlen als auch durch ein nicht differenziertes

Wuchsmuster gekennzeichnet (Petersen et al. 1992).

Differente Ergebnisse liegen zu Untersuchungen der Basalmembranstruktur in nichtinvasiven Mammakarzinomen vor. In-situ Läsionen wiesen in verschiedenen Untersuchungen kontinuierlich die Existenz von myoepithelialen Zellen (Böcker et al. 1992 Teil II) und den Basalmembranbestandteilen Laminin und Kollagen IV im Grenzbereich zum angrenzenden Stroma auf (Damiani et al. 1999; Barsky et al. 1983). Charpin und Mitarbeiter (Charpin et al. 1986) fanden auch eine kontinuierliche Lamininmarkierung im Grenzbereich zwischen intraduktalen Karzinomen und angrenzendem Stroma, auffällig waren jedoch Basalmembranverbreiterungen und -versmälerungen im Vergleich zu normalen duktalem und lobulären Epithelien.

Des Weiteren wurden in verschiedenen Arbeiten Defekte der Lamininmarkierung im Junktionsbereich von Tumorstroma und nicht-invasiven Karzinomzellen aufgezeigt, ohne dass bereits eine lichtmikroskopisch nachzuvollziehende Invasion sichtbar war (Birembaut et al. 1983; Cam et al. 1984).

Karzinome ohne konventionell nachweisbare Invasion mit jedoch immunhistochemisch darstellbaren fokalen Verlusten und Abbrüchen der Basalmembran sind von ganz besonderem Interesse, da diese Basalmembrandefekte als mögliche Indikatoren einer beginnenden bzw. fokalen Invasion angesehen werden (Barsky et al. 1983).

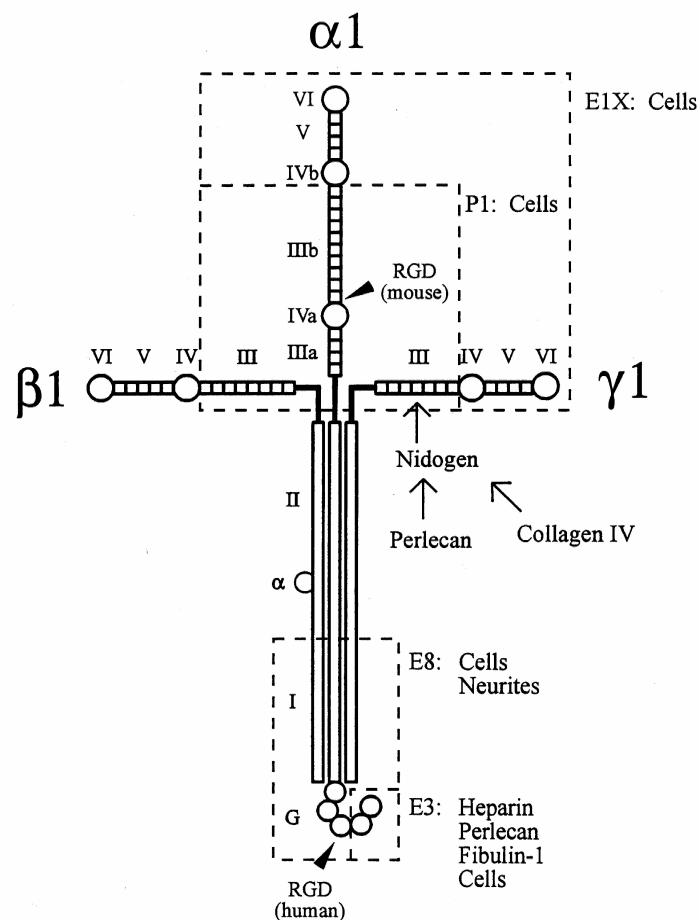
### 1.4. Die Lamininmolekülfamilie

#### 1.4.1. Die Molekülstruktur von Laminin

Laminin ist ein heterotrimeres kreuzförmiges Makromolekül mit einer Molekülmasse von zirka 850 kd (Mark und Köhl 1985). Es ist das quantitativ bedeutendste Nicht-Kollagen-Protein der epithelialen Basalmembran (Beck et al. 1990). Laminin ist besonders in der Lamina rara der Basalmembran zu finden. Zellbiologische Untersuchungen der letzten Jahre zeigten, dass Laminin nicht ein singuläres Molekül sondern eine komplexe Molekülfamilie darstellt (Sasaki et al 1988, Engel 1993).

Das Prototyp-Laminin wurde zum ersten Mal aus dem Engelbreth-Holm-Swarm-Tumor und Teratokarzinomzelllinien isoliert (Timpl et al. 1979). Letztgenannte Zelllinien synthetisieren leicht zu extrahierende basalmembranähnliche Matrixproteine.

Das EHS-Laminin besteht aus drei genetisch differenten Peptidketten, der großen 400 kd schweren  $\alpha 1$  (ehemalige A-Kette) und den beiden leichten Ketten  $\beta 1$  (B1) und  $\gamma 1$  (B2), wobei die  $\beta 1$ -Kette eine Molekülmasse von ca. 220 kD und die  $\gamma 1$ -Kette eine Molekülmasse von ca. 200 kD aufweisen (Timpl et al. 1979, Timpl and Brown 1994, Abbildung 2). Die Einzelketten sind durch Disulfidbrücken und Interaktion  $\alpha$ -helikaler Segmente miteinander verbunden. Das Laminin-Molekül ist ein multidomain-Protein: alle drei Ketten sind aus jeweils 6 Domänen aufgebaut (I-VI) (Engel 1992, Paulson et al. 1993). Zusätzliche globuläre und stäbchenförmige Domänen (IIIa, Iva) wurden in der  $\alpha 1$ -Kette beschrieben. Die Domänen I und II sind im Bereich der COOH-terminalen Endketten der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten lokalisiert sind. Die kurzen Arme des Laminin-Moleküls, welche durch die N-terminalen Anteile der Einzelketten gebildet werden, enthalten EGF-ähnliche Strukturen (EGF-like repeats) (Yurchenco und Schnitny 1990).



**Abbildung 2: Heterotrimere Struktur des Lamininmoleküls unter Darstellung der Bindungspunkte zu anderen Proteinen der Basalmembran (Timpl et Brown 1994)**

#### 1.4.2. Die Neudefinition von Laminin als Molekülfamilie

Nach der Erstbeschreibung des Laminins und seiner Kettenkomposition wurden für bekannte und neu entdeckte Proteine Homologien zu bereits charakterisierten Lamininketten aufgezeigt. Dem Rechnung tragend führten Burgeson et al. 1994 eine neue Nomenklatur für die Lamininketten, ihre Gene und die gesamten Lamininmoleküle ein, wobei die großen Ketten mit  $\alpha 1$ - $\alpha n$  und die kleinen Ketten mit  $\beta 1$ - $\beta n$  und  $\gamma 1$ - $\gamma n$  bezeichnet wurden (Burgeson et al. 1994). Neu beschriebene Isoformen der einzelnen Ketten wurden mit arabischen Zahlen nummeriert. Zu diesem Zeitpunkt waren 8 verschiedene Lamininketten und 7 Isoformen bekannt (Timpl und Brown 1994). Die Bezeich-

nung der Gene der einzelnen Ketten erfolgte durch die Kombination der lateinischen Großbuchstaben A, B und C entsprechend den Kettenbezeichnungen ( $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ ) mit arabischen Ziffern (Tabelle 1 und 2). Inzwischen wurden weitere Ketten beschrieben, so dass Laminin als eine Molekülfamilie mit einer immer größer werdenden Anzahl von Isoformen betrachtet werden kann (Kosmehl et al. 1996; Miner et al. 1997, Colognato und Yurchenco 2000, Tabelle 3).

Zum jetzigen Zeitpunkt sind 11 verschiedene Lamininketten und 15 heterotrimere Lamininmoleküle bekannt (Ekblom et al. 2003, Tabelle 4).

Lamininisoformen entstehen dabei durch einen alternativen Einbau bzw. Austausch der einzelnen Lamininketten. Die Isoformen des Laminins können sich in einer, zwei oder allen drei Ketten voneinander unterscheiden. In der Literatur werden 5  $\alpha$ -, 3  $\beta$ - und 3  $\gamma$ -Ketten beschrieben (Burgeon et al. 1994, Koch et al. 1999, Miner et al. 1995). Geht man von derzeit 5 verschiedenen  $\alpha$ -Ketten und einer möglichen gleichen Zahl der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Ketten aus, wären 125 Lamininheterotrimere möglich.

**Tabelle 1: Übersicht nach R.E. Burgeson et al. über die Nomenklatur der Lamininketten und der entsprechenden Gene (1994).**

Kettenbezeichnung nach neuer Nomenklatur	Kettenbezeichnung nach alter Nomenklatur	Gene
$\alpha 1$	A, Ae	LAMA1
$\alpha 2$	M, Am	LAMA2
$\alpha 3$	200 kDa	LAMA3
$\beta 1$	B1, B1e	LAMB1
$\beta 2$	s, B1s	LAMB2
$\beta 3$	140 kDa	LAMB3
$\gamma 1$	B2, B2e	LAMC1
$\gamma 2$	B2t	LAMC2

**Tabelle 2: Übersicht über die Nomenklatur der bisher beschriebenen heterotrimeren Erscheinungsformen des Lamininmoleküls nach Burgeson (1994).**

Bezeichnung nach neuer Nomenklatur	Kettenkomposition	Bezeichnung nach alter Nomenklatur
Laminin-1	$\alpha 1\beta 1\gamma 1$	EHS-Laminin
Laminin-2	$\alpha 2\beta 1\gamma 1$	Merosin
Laminin-3	$\alpha 1\beta 2\gamma 1$	s-Laminin
Laminin-4	$\alpha 2\beta 2\gamma 1$	s-Merosin
Laminin-5	$\alpha 3\beta 3\gamma 2$	Kalinin/Nicein
Laminin-6	$\alpha 3\beta 1\gamma 1$	k-Laminin
Laminin-7	$\alpha 3\beta 2\gamma 1$	ks-Laminin

**Tabelle 3: Daneben sind weitere folgende Lamininisoformen und deren Kettenkompositionen charakterisiert worden (Colognato und Yurchenco 2000).**

Laminin-8	$\alpha 4\beta 1\gamma 1$
Laminin-9	$\alpha 4\beta 2\gamma 1$
Laminin-10	$\alpha 5\beta 1\gamma 1$
Laminin-11	$\alpha 5\beta 2\gamma 1$

**Tabelle 4: Aktuelle Erweiterung der Lamininisoformen und deren Kettenkompositionen (Ekblom et al 2003).**

Laminin-12	$\alpha 2\beta 1\gamma 3$
Laminin-13	n.n.
Laminin-14	$\alpha 4\beta 2\gamma 3$
Laminin-15	$\alpha 5\beta 2\gamma 3$

#### 1.4.3. Aufbau, grundsätzliche Prinzipien der geweblichen Verteilung und Funktion ausgewählter Lamininisoformen

Die einzelnen Lamininisoformen, charakterisiert durch die einzelnen Kettenkompositionen, weisen eine differente, für sie kennzeichnende Positionierung bezüglich der Gewebsdifferenzierung als auch der Gewebsreifung auf und sind somit als strukturbestimmend und -erhaltend anzusehen (Aumailley and Smyth 1998)

### Laminin-1

Der Prototyp des Laminin besteht aus der  $\alpha 1$ ,  $\beta 1$  und  $\gamma 1$ -Kette (EHS-Laminin) und fungiert als entscheidendes Lamininmolekül während der frühen Embryogenese (Smyth et al. 1999). Während die  $\alpha 1$ -Kette im Blastocystenstadium, der fetalen Neuroretina, dem Gehirn als auch der fetalen Niere nachzuweisen ist, kann sie im adulten Gewebe zumeist nicht mehr gefunden werden (Sorokin et al. 1997). In adulten Geweben existiert eine sehr begrenzte Verteilung, z.B. proximale Nierentubuli (Virtanen et al. 2000)

### Laminin-2

Durch den alternativen Austausch der  $\alpha 1$  durch die  $\alpha 2$ -Kette entsteht Laminin-2 (Merosin). Die  $\alpha 2$ -Kette besitzt etwa die gleiche Länge wie die  $\alpha 1$ -Kette, ist jedoch in 300 kDa und 80 kDa-Untereinheiten gespalten (Ehring et al. 1990)

Gefunden wurde diese Lamininkette zunächst in der Throphoblastmembran der Plazenta (Leivo et al. 1988). Die  $\alpha 2$ -Kette konnte weiterhin in endoneuralen Basalmembranen, in der synaptischen und extrasynaptischen Region des Skelettmuskels (Sanes et al. 1990), in der Basallamina muriner Kardiomyozyten (Paulson et al. 1989) sowie in der glomerulären mesangialen Matrix (Hori et al. 1994) nachgewiesen werden.

Auch ein Nachweis in humanen Myoepithelien gelang (Strassburger et al. 1998).

Die Bedeutung  $\alpha 2$ -Lamininkette für die Entwicklung und den Strukturerhalt von muskulären und nervalen Strukturen wird bei Erkrankungen deutlich, die mit einer Mutation des LAMA2-Genes assoziiert sind. Mindestens die Hälfte aller Krankheitsbilder einer kongenitalen Muskeldystrophie sind mit Strukturstörungen der  $\alpha 2$ -Kette verbunden (Pegoraro et al. 1998).

Bernier und Mitarbeiter wiesen mittels Northern Blot-Analyse eine positive mRNA-Expression in Herz, Niere, Leber, Lunge, Haut und Muskel neugebore-



ner Mäuse nach (Bernier et al. 1994).

Humanes fetales Gewebe zeigte eine positives in-situ Hybridisierungsergebnis für die  $\alpha 2$ -mRNA in vielen Geweben wie Herz, Pankreas, Lunge, Milz, Niere, Haut, Testis, Meningen und einigen Hirnarealen, jedoch nicht in Leber, Thymus und Knochen (Vuolteenaho et al. 1994).

### Laminin-3

Durch den Austausch der  $\beta 1$ - durch die  $\beta 2$ -Kette in Kombination mit der  $\alpha 1$ - und der  $\gamma 1$ -Kette werden die Eigenschaften von Laminin-3 bestimmt. (Ivanainen et al. 1994)

Die  $\beta 2$ -Kette als Bestandteil von Laminin-3 (s-Laminin) wurde zuerst von Sanes und Mitarbeitern in der synaptischen Basalmembran der neuromuskulären Endplatte (Sanes et al. 1990) der Skelettmuskulatur beschrieben. Weiterhin war die  $\beta 2$ -Kette im Bereich der perineuralen Basalmembran von Nervenfasern, in der Basalmembran von Arterien und in der glomerulären Basalmembran der Niere nachweisbar (Martin et al. 1995).

Ein Nachweis der  $\beta 2$ -Kette in der Basalmembran von Kapillaren, den Tubuli der Niere, des Endoneuriums sowie extrasynaptischer Muskelfasern gelang nicht (Sanes et al. 1990).

Wewer und Mitarbeitern gelang es 1994, die  $\beta 2$  Ketten-cDNA aus verschiedenen Karzinomzelllinien zu isolieren und die chromosomale Lokalisation des LAMB2-Genes zu bestimmen (Wewer et al. 1994).

### Laminin-5

1991 gelang es Rousselle und Mitarbeitern, ein epitheliales basalmembranspezifisches Adhäsionsmolekül zu definieren, welches als Kalinin bezeichnet wurde und identisch dem Nicein ist (Rousselle et al. 1991, Markinovich et al. 1993).

Durch Laminin-5 werden die Epithelzellen mit der Basalmembran verknüpft, so dass dem Molekül eine wichtige Bedeutung für die mechanische Veranke-

rung des Epithelverbandes zukommt (Rousselle et al. 1994).

Kalinin wurde mittels Immunfluoreszenz in subepithelialer Lokalisation in der Haut, der Trachea, des Ösophagus und der Cornea, nicht jedoch in den Nieren und in der Basalmembranregion von Blutgefäßen, Nerven oder im Knorpelgewebe nachgewiesen (Rousselle et al. 1991).

Epiligrin, ein durch Carter und Mitarbeiter beschriebenes Molekül (Carter et al. 1991), ist dem Kalinin/Nicein strukturell sehr ähnlich, aber nicht identisch. Laminin-5 besteht aus einer  $\alpha 3$ -Kette, der  $\beta 3$ -Kette (Pulkkinen et al 1994) und der kurzen  $\gamma 2$ -Ketten-Sequenz (Kallunki et al. 1992).

Matsui und Mitarbeiter konnten aus SCC-25 Zellfraktionen sowohl Monomere der drei Lamininketten ( $\alpha 3$ ,  $\beta 3$ ,  $\gamma 2$ ) als auch das heterodimere Molekül  $\beta 3\gamma 2$  und das heterotrimere Lamininmolekül  $\alpha 3\beta 3\gamma 2$  isolieren.

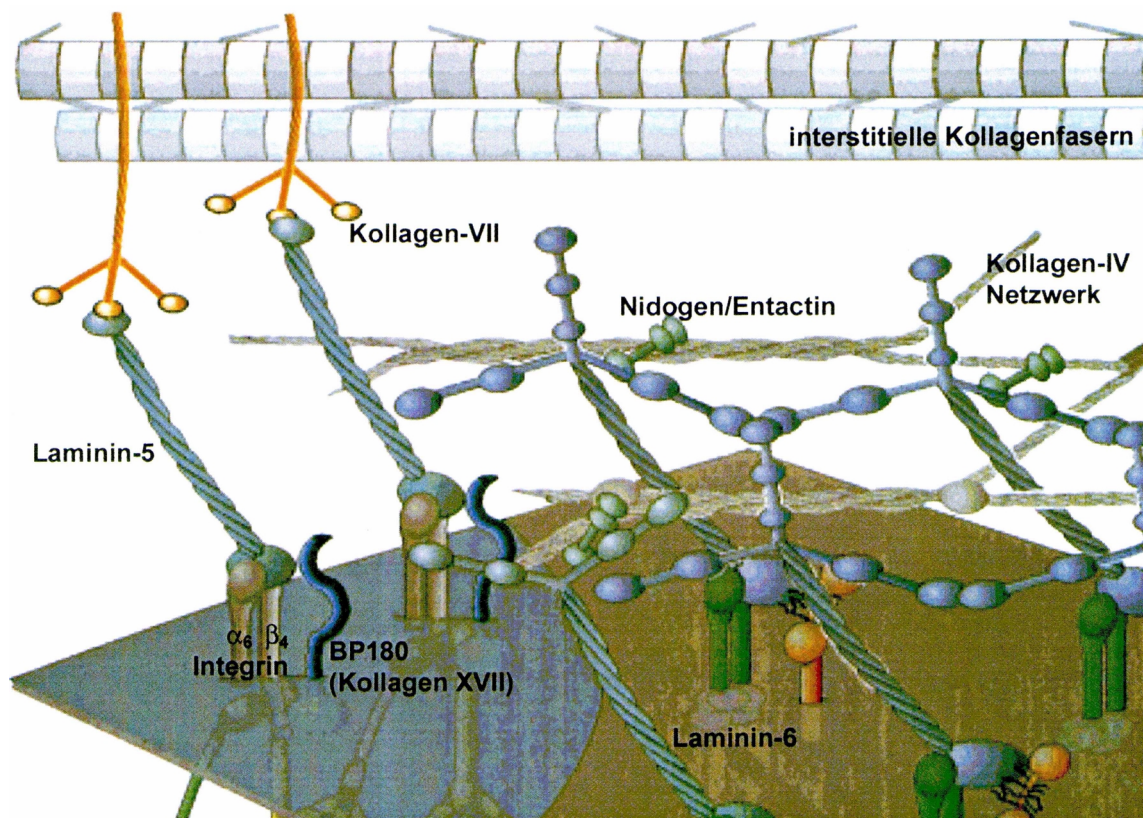
Sie postulierten die Anlagerung der  $\alpha 3$ -Kette an das bereits zuvor aggregierte  $\beta 3\gamma 2$ -Heterotrimer zu Laminin-5 (Matsui et al. 1995). Laminin-5 wird als heterotrimere hochmolekulare Präkursorform sezerniert und durchläuft anschließend eine Prozessierung, die eine weitere Verkürzung der  $\alpha$ -Kette und  $\gamma$ -Kette bewirkt (Markinovich et al. 1992). Folge ist, dass Laminin-5 nicht das klassische kreuzförmige Aussehen der Laminine besitzt, sondern eher eine stabförmige Konfiguration aufweist (Abbildung 4).

Die  $\gamma 2$ -Kette besitzt eine Molekülmasse von ca. 130kDa und unterscheidet sich somit von den anderen Leichtketten  $\beta 1$  und  $\gamma 1$ , die eine Molekülmasse von 200 kDa aufweisen. Die  $\gamma 2$ -Kette ist durch das Fehlen der aminoterminalen globulären Domäne IV gekennzeichnet, welche als Bindungsstelle der Lamininmoleküle untereinander angesehen wird. Weiterhin sind die Domänen III, IV und V kürzer als in der  $\gamma 1$ -Kette. Aufgrund fehlender verantwortlicher Moleküldomänen ist Laminin-5 nicht in der Lage selbständig zu polymerisieren oder an Entaktin/Nidogen zu binden (Cheng et al. 1997). Als bevorzugte Liganden von Laminin-5 wurden die Integrinmoleküle  $\alpha 6\beta 4$ ,  $\alpha 3\beta 1$  und  $\alpha 6\beta 1$ , Laminin-6, Laminin-7 und Kollagen VII beschrieben (Champlaud et al 1996).

Die Lamininkette  $\gamma 2$  kann in der Basalmembran einer Vielzahl epithelialer Gewebe nachgewiesen werden, beispielsweise in der Prostata, dem Dünndarm, dem Magen, der Niere, der Lunge und der Haut. Da dieses Matrixmolekül

auch in der Umgebung kleiner Venen und Arterien des Thymus und der Milz nachweisbar ist, erscheint auch eine Beteiligung an der Prägung lymphatischer Zellen möglich (Mizushima et al.1998).

Laminin-5 als eine epithelspezifische Lamininisoform ist Bestandteil der Ankerfilamente der Lamina lucida der Epidermis. Die Ankerfilamente besitzen eine Brückenfunktion zwischen den Hemidesmosomen der Zelle und der Lamina densa der Basalmembran und bedingen die Adhäsion des Epithels an der Basalmembran und somit den Strukturhalt. (Colognato und Yurchenco 2000, Abbildung 3)



**Abbildung 3: Schematische Darstellung der Basalmembran mit hemidesmosomalem Adhäsionskomplex (modifiziert nach Colognato und Yurchenco, 2000) Laminin-5 ist über den extrazellulären Anteil des  $\alpha_6\beta_4$  Integrins an das Hemidesmosom gebunden und vermittelt die Anheftung an Kollagen-VII.**

Bei bestimmten blasenbildenden Dermatosen (z.B. vernarbendes Pemphigoid) mit dem morphologischen Korrelat einer gestörten Zell-Basalmembran-Adhäsion konnten Autoantikörper gegen Ketten des Laminin-5 Moleküls (Strukturbestandteil der Ankerfilamente) nachgewiesen werden (Moll und Moll 1998).

Genetische Defekte mit Mutationen des  $\alpha 3$ -Kettengenes, des  $\beta 3$ -Kettengenes auch des  $\gamma 2$ -Kettengenes liegen der Epidermiolysis junctionalis bullosa zugrunde (Pulkkinen et al. 1994, Aberdam et al. 1994, Kivirikko et al. 1995).

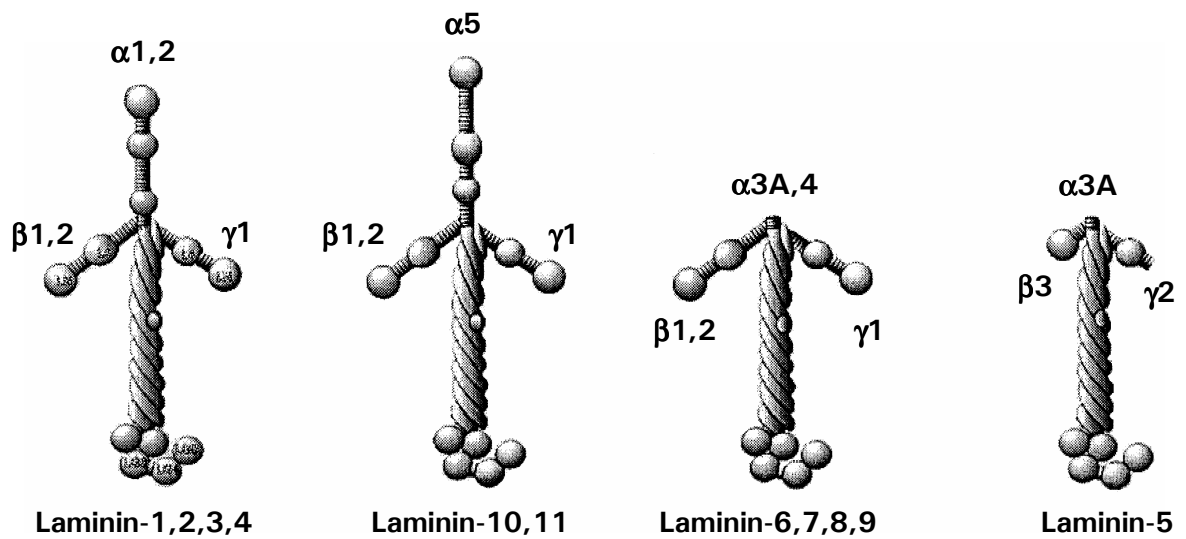
### **Laminin-6 und Laminin-7**

Vom Kalinin-Molekül wurde ein weiterer Vertreter der Lamininfamilie mit bevorzugter Lokalisation in den Ankerfilamenten der dermo-epidermalen Junction abgegrenzt: Laminin-6 bzw. k-Laminin (Markinovich et al. 1992). Das Protein besteht aus den leichten Ketten  $\beta 1$  und  $\gamma 1$ , wie sie von Laminin-1 bekannt sind, und der  $\alpha 3$ -Kette.

Laminin-7 (ks-Laminin) unterscheidet sich von Laminin-6 durch den Austausch der  $\beta 1$ - gegen die  $\beta 2$ -Kette.

Obwohl in der neuen Laminin-Nomenklatur die  $\alpha$ -Ketten von Laminin 5-7 als identisch angegeben werden, ist diese Homologie nicht gesichert (Galliano et al. 1995).

So beschrieben Ivanainen und Mitarbeiter 1995 eine weitere schwere Kette, die  $\alpha 4$ -Kette, deren Domänen- und Primärstruktur sie isolierten. Mittels Northern Blot-Analyse konnten sie die  $\alpha 4$ -mRNA in fetalem Lungen- und Nierengewebe nachweisen, nicht aber in Leber- und Hirngewebe (Ivanainen et al. 1995). In humanem adulten Gewebe waren die stärksten Signale im Myokard, etwas geringer im Ovar, der Leber, der Lunge und der Plazenta vorhanden.



**Abbildung 4:** (modifiziert nach Colognato und Yurchenco, 2000) In den Modellen repräsentieren die Kugeln die globulären Domänen, die Spiralen die helikalen Abschnitte und die kleinen Segmente in den kurzen Armen die EGF-ähnlichen Sequenzen. Laminin-5 ist als einziges Laminin in allen Ketten verkürzt. Die Laminine 6, 7, 8 und 9 sind nur in der  $\alpha$ -Kette verkürzt. Die Laminine 10 und 11 weisen die besonders lange  $\alpha5$ -Kette auf. Zu der Gruppe der klassischen Laminine gehören die Laminine 1, 2, 3, 4 und vermutlich Laminin-12, da sich die Strukturen der  $\gamma3$ -Kette und der  $\gamma1$ -Kette sehr ähnlich sind.

### 1.5 Zielstellung

In zahlreichen Untersuchungen normaler embryonaler und adulter humaner parenchymatöser Gewebsstrukturen konnte gezeigt werden, dass die dort nachgewiesenen Lamininisoformen eine reife- und differenzierungsabhängige Expression aufweisen. Auch existieren differente Darstellungsmuster der einzelnen Lamininketten bei vergleichender Betrachtung von verschiedenen Tumoren, entzündlichen Prozessen oder degenerativen Veränderungen.

Systematische vergleichende Untersuchungsergebnisse bezüglich der Verteilung der einzelnen Lamininisoformen im Bereich der Basalmembran in normalem adulten Parenchym der Brustdrüse, nicht malignen epithelial-proliferierenden Läsionen der Mamma, nichtinvasiven duktalem Karzinomen sowie invasiv-duktalem und invasiv-lobulärem Karzinomen sind bisher kaum verfügbar.

Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung der Basalmembranconstitution duktalem und lobulärem Strukturen der Mamma in Bezug auf das Auftreten differenter Lamininketten und die Darstellung der Verteilung von Lamininketten in der Basalmembran normaler epithelialer Strukturen im Vergleich zu benignen und malignen Läsionen.

Neben der semiquantitativen Beurteilung der Verteilung der einzelnen Lamininketten im Bereich der Epithel-Stroma-Grenze soll die Ablagerung der einzelnen Lamininkettendeposite auch außerhalb der Basalmembran im Zytoplasma bzw. intranukleär beurteilt werden.

Es wird auch das Basalmembranbild im Hinblick auf einen kontinuierlichen oder diskontinuierlichen Verlauf bewertet.

Unterschiede bezüglich der differenten qualitativen und quantitativen Lamininkettendeposition insbesondere zwischen malignen und benignen epithelialen Läsionen werden hinsichtlich der Fragestellung diskutiert, ob einzelne der Ketten als mögliche Dignitätsmarker Bedeutung für die diagnostische Pathologie haben könnten.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Untersuchungsmaterial

Es wurden 52 Mammaexzisate untersucht, die im Rahmen der Eingangsdiagnostik im Institut für Pathologie der Friedrich Schiller-Universität Jena beurteilt wurden (Jahrgänge 1993-1998). Zusätzlich wurden Tumorgewebsanteile unmittelbar postoperativ für die Kryokonsevirung aufgearbeitet.

Präparate mit folgenden Veränderungen der Mamma wurden für diese Arbeit ausgewählt und bearbeitet:

1. Sklerosierende Adenose (sclerosing adenosis, WHO-Klassifikation 2003), gekennzeichnet durch eine kompakte Proliferation von Azini mit Erhalt des luminalen Epithels und angrenzender peripherer myoepithelialer Zellschicht bei intakter Basalmembran.
2. Duktale Epithelhyperplasie (usual ductal hyperplasia, UDH, WHO-Klassifikation 2003), ist zellbiologisch definiert als eine benigne Proliferation CK5/14-positiver Progenitorzellen mit glandulärer Differenzierung einer heterogenen Zellpopulation unterschiedlichen Musters und Ausmaßes.
3. Fibroadenome (fibroadenoma, WHO-Klassifikation 2003), definiert als benigne biphasische fibroepitheliale Tumoren, charakterisiert durch Hyperplasie des Mantelgewebes der Drüsenläppchen mit Verformung und Kompression der duktulo-lobulären Gangsegmente. Das glanduläre Epithel ist ohne zytologische Atypien.
4. Duktale Carcinomata in situ (DCIS) (ductal carcinoma in situ, WHO-Klassifikation 2003), sie umfassen eine heterogene Gruppe von in situ-Neoplasien, deren gemeinsames Merkmal die Proliferation von kohäsiv wachsenden Tumorzellen darstellt. Die atypische Proliferation ist auf das Gang-

lumen begrenzt, ein infiltratives Wuchsverhalten liegt nicht vor.

Die intraduktalen Karzinome wurden nach Kriterien der EORTC auf der Grundlage der Klassifikation nach Holland (Holland 1994) klassifiziert.

**Niedriger Malignitätsgrad:** monomorphes Kernmuster ohne Größen- und Formschwankungen Tumorzellkerne mit fein verteiltem Chromatin und fehlenden oder unauffälligen Nukleolen. Meist mikropapilläres oder cribriformes, seltener solides Wachstum. Häufig mikronoduläre, psammomatöse Verkalkungen.

**Mittlerer Malignitätsgrad:** Intermediäre Kernpolymorphie mit leichten Unregelmäßigkeiten in Kontur und Form der Kerne ,gröberes Chromatinmuster und einzelnen Nukleolen. Cribriformes oder solides Wachstum. Komedonekrosen sind selten.

**Hoher Malignitätsgrad:** Es finden sich große vesikuläre oder hyperchromatische Kerne mit Anisonukleose und Kernpolymorphie, es sind atypische Mitosen nachweisbar. Häufig liegen prominente Nukleolen vor. Das Wachstumsmuster ist überwiegend solide. Häufige Komedonekrosen.

5. Invasiv-duktales Karzinom. (invasive ductal carcinoma, not otherwise specified, NOS, WHO-Klassifikation 2003) charakterisiert als heterogene Gruppe invasiver Karzinome ohne „weitere Spezifizierung“. Die Graduierung erfolgt nach Elston und Ellis (Elston and Ellis 1998), wobei hier die Einzelkriterien Tubulusbildung, Kernpleomorphie sowie die Mitoserate mit Punkten bewertet und zu einem Score zusammengefasst werden, der dann den Malignitätsgrad angibt.
6. Invasiv-lobuläres Karzinom (invasive lobular carcinoma, WHO-Klassifikation 2003) sind prinzipiell gekennzeichnet durch eine schmal-trabekuläre Anordnung nicht kohäsiver Zellen in einem fibrösen Stroma. Bei der Graduierung dieser Karzinome gehen die verschiedenen Wuchsvarianten und die Mitoserate ein, auch hier wird ein Scorewert ermittelt. Die tubulolobulären und alveolären Varianten werden mit einem niedrigen Maligni-



tätsgrad (G1) bewertet, die soliden und pleomorphen Karzinome werden als höhergradig maligne (G3) eingeordnet. Einen mittleren Malignitätsgrad (G2) besitzen siegelringzellige Tumoren und Karzinome mit klassischem Differenzierungsmuster (Sinn et al 1997).

Am Operationsmaterial der malignen epithelialen invasiven Mammaläsionen wurde die Tumorgröße unter Darstellung der Beziehung zur Pektoralismuskulatur oder zur Mamille ermittelt und entsprechend der pTNM-Klassifikation der UICC eingeordnet (Wittekind et al. 2004).

Die Diagnosestellung der benignen und malignen Erkrankungen erfolgte in jedem Fall am HE-gefärbten Paraffinschnitt entsprechend WHO-Klassifikation (2003).

**Folgende 52 Präparate wurden im Rahmen dieser Arbeit untersucht:**

**14 Benigne epitheliale Läsionen der Mamma:**

- 3 Fälle Sklerosierende Adenose
- 9 Fälle Duktale nichtatypische Epithelhyperplasie
- 2 Fälle Fibroadenom

**9 Intraduktale Karzinome:**

- 7 Fälle G II:
- 2 Fälle G III:

**16 invasiv duktale Karzinome mit mittlerem und schlechten Differenzierungsgrad und folgenden Tumorstadien:**

- 8 Fälle G II: pT1c
- 4 Fälle G II: pT2
- 2 Fälle G III: pT1c
- 1 Fall G III: pT2
- 1 Fall G III: pT4

**13 invasiv-lobuläre Karzinome mit folgenden Tumorstadien:**

- 6 Fälle G II: pT1c
- 4 Fälle G II: pT2
- 1 Fall G II: pT3
- 1 Fall G III: pT1b
- 1 Fall G III: pT3

## 2.2 Histologische Technik

### 2.2.1 Aufarbeitung des Gewebematerials

Ca. 10 x 3 x 4 mm große Proben des nativen Operationspräparates wurden zunächst mit TISSUE TEK (Sakura Finetek Europe B.V., Zoewoude Niederlande) vorbehandelt, um eine gefrierbedingte Schrumpfung des Gewebes zu verhindern. Anschließend wurden die Gewebeproben in Stickstoff-gekühltem flüssigem Propan schockgefroren und bei -70 Grad Celsius gelagert.

Die Laminineinzelketten wurden immunhistochemisch unter Verwendung monoklonaler Antikörper an 5 µm dicken Aceton-fixierten Kryostatschnitten nachgewiesen.

### 2.2.2 Übersicht der applizierten Antikörper

Laminin- $\alpha$ 2-Kette: Nachweis durch den monoklonalen Antikörper 5H2 in 5000-facher Verdünnung (Engvall et al. 1990),  
Quelle: Telios, USA

Laminin- $\alpha$ 3-Kette: Nachweis durch den monoklonalen Antikörper BM 165 in 5000-facher Verdünnung (Rousselle et al. 1991; Markinovich et al. 1993) Dieser Antikörper wurde durch Dr. Patricia Rousselle Institut de Biologie et Chimie des Proteines, Universite Lyon I, Frankreich zur Verfügung gestellt.

Laminin- $\alpha$ 5-Kette: Nachweis durch den monoklonalen Antikörper 4C7 in 10000-facher Verdünnung (Engvall et al. 1990)

Laminin- $\beta$ 1-Kette: Nachweis durch den monoklonalen Antikörper 4E10 in einer Verdünnung von 1: 20000 (Wewer et al. 1993 und 1994), Quelle: Telios, USA

Laminin- $\beta$ 2-Kette: Nachweis durch den monoklonalen Antikörper C4 in 3000-facher Verdünnung (Hunter et al. 1989; Sanes et al. 1990) Quelle: DSHB, National Institute of Child Health and Human Development, Baltimore, Telios, USA

Laminin- $\gamma$ 1-Kette: Nachweis durch den monoklonalen Antikörper 2E8 in 500-facher Verdünnung (Wewer et al. 1983; Engvall et al. 1986) Quelle: Telios, USA

Laminin- $\gamma$ 2-Kette: Nachweis durch den monoklonalen Antikörper GB 3 in 10-facher Verdünnung (Hsi and Yeh 1986; Yeh et al., 1986; Matsui et al., 1995)  
Quelle: Harlan Sera-lab, England

### 2.2.3 APAAP-Methode als Nachweismethode der primären Antikörper

Zum immunhistochemischen Nachweis der im Gewebe gebundenen Antikörper wurde die APAAP-Methode (Alkalische Phosphatase Anti-Alkalische Phosphatase) nach einem modifizierten Protokoll von Gustmann und Mitarbeitern (Gustmann et al. 1991) angewandt.

Die primären Antikörper wurden wie in Übersicht 2.2.2 angegeben in background reducing medium (Dako, Glostrup, Dänemark) verdünnt.

Nach der Inkubation der Schnitte mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4°C erfolgte eine Behandlung mit einem Kaninchen-Anti-Maus-Serum (Dako, Dänemark, Verdünnung: 1:70 in Verdünnungspuffer für Brückenantikörper, siehe 2.2.4). für 45 min bei Raumtemperatur gefolgt von einer Inkubation mit APAAP-Komplex (Dako, Dänemark, Verdünnung: 1:70 in Verdünnungssantikörper für APAAP-Komplex, siehe 2.2.4.). Zur Steigerung der Sensitivität der Methode wurde die Behandlung mit dem Kaninchchen-anti-Maus-Serum und dem APAAP-Komplex zweimal wiederholt. Zwischen allen Inkubationen wurden die Schnitte gründlich in Tris-gepufferter Kochsalzlösung (TBS, siehe 2.2.4) gespült. Zum Nachweis der gebundenen alkalischen

Phosphatase wurde Naphtol-AS-biphosphat/Neufuchsin (Entwicklerlösung siehe 2.2.4) unter lichtmikroskopischer Kontrolle angewandt. Zur Blockierung der endogenen Enzymaktivität wurde der Entwicklerlösung 0,25 mmol Levamisol (Sigma, St. Louis USA) zugesetzt. Danach wurden die Schnitte gründlich in Leitungswasser gespült und in Glycerol/Gelatine eingedeckt.

Zur Bewertung der Immunreaktion wurde der primäre Antikörper durch nicht-immunes Serum als Negativkontrolle ersetzt.

### **2.2.4. Verzeichnis der Puffer-, Farb- und Fixierungslösungen für die Immunhistochemie**

PBS (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)

8 g NaCl  
0,2 g KCl  
1,15 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$   
0,2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
auf 1000 ml Aqua dest.

TBS (Tris-gepufferte Kochsalzlösung)

2,25 g Tris-Base  
17,125 g Tris/HCL  
21,95 g NaCl  
auf 2500 ml Aqua dest.  
PH 7,4-7,6

Puffer für das APAAP-System

### Tris-Puffer

0,45g Tris/Base  
3,425g Tris/HCl  
0,5g Natriumazid  
auf 500ml Aqua dest.

### Verdünnungslösung für Primärantikörper

10% (v/v) RPMI-Medium in Tris-Puffer  
1% (w/v) Rinderserumalbumin (Trockensubstanz)  
ph 7,4

### Verdünnungslösung für Brückenantikörper

10% (v/v) RPMI-Medium in Tris-Puffer  
10% (v/v) inaktiviertes Humanserum

### Verdünnungslösung für APAAP-Komplex

10% (v/v) RPMI-Medium in Tris-Puffer

### Entwicklungslösung (100 ml Ansatz)

70 ml Entwicklungspuffer (a)  
25 ml Propandiollösung (b)  
40 mg Levamisol  
0,5 ml Na-Nitritlösung (c)  
0,135 ml Neufuchsinlösung (d)  
0,6 ml Naphtol-AS-BI-Phosphatlösung (e)  
auf 100ml Aqua dest.

a) Entwicklungspuffer  
34,8g NaCl  
6,0g Tris/HCl  
19,6g Tris/Base  
auf 700ml Aqua dest.

- b) Propandiollösung  
21g 2-Amino-2-methyl-1,3-propandiol  
auf 1000 ml Aqua dest.
  
- c) Natrium-Nitritlösung  
30mg Na-Nitrit auf 1000 ml Aqua dest.
  
- d) Neufuchsinlösung  
5 g Neufuchsin ad  
100 ml 2N HCl
  
- e) Naphtol-AS-BI-Phosphat  
350mg Naphtol-AS-BI-Phosphat  
auf 6ml DMF

### 2.2.5. Bewertungskriterien der immunhistochemischen Reaktionen

In der Basalmembran epithelialer Strukturen beziehungsweise im Epithel-Stroma-Grenzbereich von normalem adulten Mammagewebe, Fibroadenomen, sklerosierenden Adenosen, nichtatypischen intraduktalen Epithelhyperplasien, intraduktalen, sowie invasiv duktalem und lobulären Karzinomen wurde die Deposition der Lamininketten  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\gamma 1$  und  $\gamma 2$  beurteilt.

Betrachtet wurden Basalmembranabbrüche sowie positive kernbezogene oder zytoplasmatische Reaktionen für Lamininketten in den Epithelzellen.

Positive Immunmarkierungen in Blutgefäßen, Nerven-, Muskel-, Fett- und Bindegewebszellen wurden im Ergebnisteil nicht bewertet, sondern dienten als positive Kontrollreaktion der Spezifität der Antikörper beziehungsweise der Immunreaktionen.

Es erfolgte die semiquantitative Bewertung der Lamininkettendeposition:

- |         |  |
|---------|--|
| Ø       | - keine Markierung der Basalmembran bzw. der Grenzzone zwischen Tumorzellen und Stroma   |
| +       | - zarte z.T. verschwommene Markierung der Basalmembranregion/Epithel-Stroma-Junktionszone mit nur herdförmig markierten Arealen, insgesamt sind weniger als 10% dieser Regionen markiert |
| + +     | - gut erkennbare Immunmarkierung der Basalmembran/Epithel-Stroma-Junktionszone, wobei insgesamt nicht mehr als 50% der entsprechenden Areale markiert werden                             |
| + + +   | -Immunmarkierung der Basalmembran bzw. Tumor-Stroma-Grenze mit streckenweisen Abbrüchen, insgesamt mehr als 50% der Junktionszonen markiert  |
| + + + + | - breite sehr deutliche Markierung der Basalmembran ohne Abbrüche  |

Die beobachteten Differenzen der Farbintensität zwischen den einzelnen Ketten lassen jedoch keine Rückschlüsse auf die quantitative Sekretion zu, da die einzelnen Lamininketten zu den applizierten Antikörpern eine unterschiedliche Affinität besitzen können.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Immunhistochemischer Nachweis der Lamininketten in normalem adulten duktalem und lobulärem Epithel der Mamma

Herangezogen wurden Präparate, in denen, außer den noch zu beschreibenden Läsionen, normales Mammaparenchym vorlag.

Die Basalmembran im normalen adulten duktalem und lobulärem Epithel der Mamma stellte sich als scharf konturiertes kontinuierliches Band ohne Verbreiterungen oder Abbrüche dar. Die Immunmarkierung war auf die Basalmembranregion begrenzt, zytoplasmatische Farbreaktionen lagen nicht vor.

Antikörper gegen die  $\alpha 5$ -Kette markierten alle Basalmembranen des duktalem und lobulärem Epithels in gleichmäßiger Verteilung und Intensität ohne Abbrüche.

Die Immunreaktion mit Antikörpern gegen die  $\beta 1$ -Kette zeigte ebenfalls eine kontinuierliche Markierung aller lobulären und duktalem Basalmembranen. Die Farbintensität im Vergleich zur  $\alpha 5$ -Kette war schwächer ausgeprägt.

Antikörper gegen die  $\gamma 1$ -Kette reagierten mit allen epithelialen Basalmembranen ohne Unterbrechungen, wobei der Grad der Immunfärbung dem der  $\alpha 5$ -Kette entsprach (Abbildung 5).

Die  $\beta 2$ -Kette war ebenfalls in allen duktalem Basalmembranen nachweisbar, es zeigte sich jedoch im Vergleich zu allen anderen Ketten eine etwas verbreiterte, zum Teil unscharf abgrenzbare Farbreaktion. Die Immunreaktion war kontinuierlich ohne Unterbrechungen in der Basalmembran vorhanden, zusätzlich waren herdförmig zarte Zellgrenzmarkierungen erkennbar (Abbildung 5). Die lobulären Basalmembranen wiesen zum Teil eine schwächere Markierung für diese Kette auf.

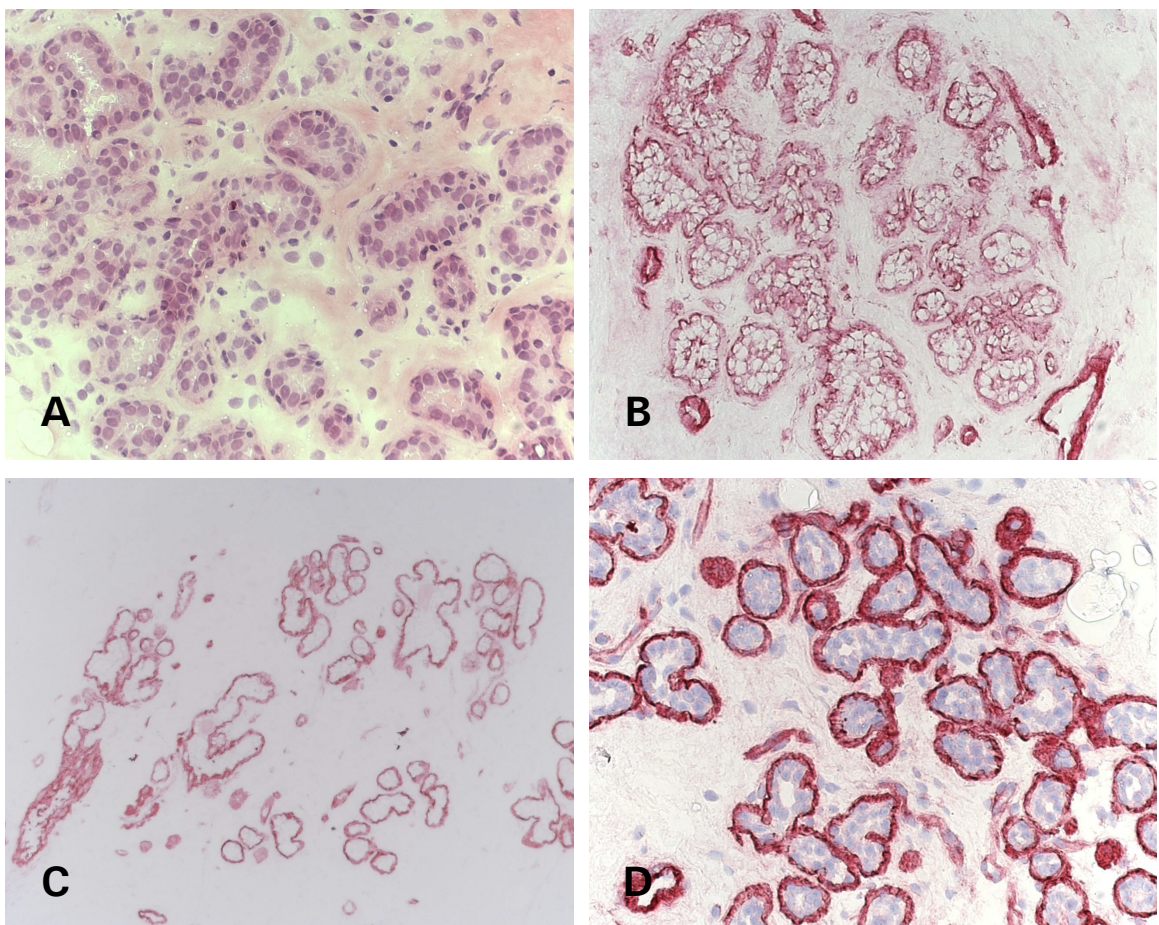
Die  $\alpha 2$ -Kette war ebenfalls in den epithelialen Basalmembranen erkennbar, es



zeigte sich jedoch eine etwas verbreiterte, unscharf abgrenzbare, kontinuierliche Farbreaktion.

Eine sehr deutliche, kontinuierliche farbintensive Markierung konnte mit Antikörpern gegen die  $\alpha 3$ -Kette in allen lobulären und duktalem Basalmembranen erzielt werden (Abbildung 5).

Auch die  $\gamma 2$ -Kette zeigte stets eine sehr deutliche kontinuierliche Expression in der duktalem Basalmembran, die der  $\alpha 3$ -Kette identisch war.



**Abbildung 5:** Darstellung regelhafter lobulärer Strukturen der Mamma mit Antikörpern gegen verschiedene Lamininketten.

**A.** HE-Präparat (zum Vergleich, Vergrößerung 150fach).

**B.** Der Antikörper C4 gegen die  $\beta$ -2Kette zeigt eine kontinuierliche Markierung der Basalmembranen und der Zellgrenzstrukturen (Vergrößerung 150fach).

**C.** Der Antikörper 2E8 gegen die  $\gamma$ 1-Kette markiert kontinuierlich die Basalmembranen der Läppchen (Vergrößerung 75fach).

**D.** Intensive positive Markierung der epithelialen Basalmembran mit dem Antikörper BM165 gegen die  $\alpha$ 3-Kette (Vergrößerung 150fach).

### 3.2. Verteilungsmuster der einzelnen Lamininketten in sklerosierenden Adenosen

Eine kontinuierliche Basalmembranmarkierung der proliferierenden tubulären Strukturen konnte für die Lamininketten  $\alpha 3$  und  $\gamma 2$  nachgewiesen werden, die Markierung war auf den Grenzbereich zwischen epithelialer und Stroma-komponente beschränkt.

Auch die  $\alpha 5$ -Kette (Abbildung 6) und die  $\gamma 1$ -Kette konnten in kontinuierlicher Markierung im Bereich der epithelialen Basalmembran aufgezeigt werden.

Nur kleinherdige Unterbrechungen der Markierung im Basalmembranbereich waren für die  $\beta 1$ - und  $\beta 2$ -Ketten festzustellen, es muss aber auch an eine eventuell nicht optimale Anfärbung der epithelialen Basalmembran gedacht werden. Zum Teil zeigte sich eine etwas unscharf abgegrenzte und verbreiterte Markierung. Die  $\beta 2$ -Kette zeigte zusätzlich eine positive Zellgrenzmarkierung (Abbildung 6).

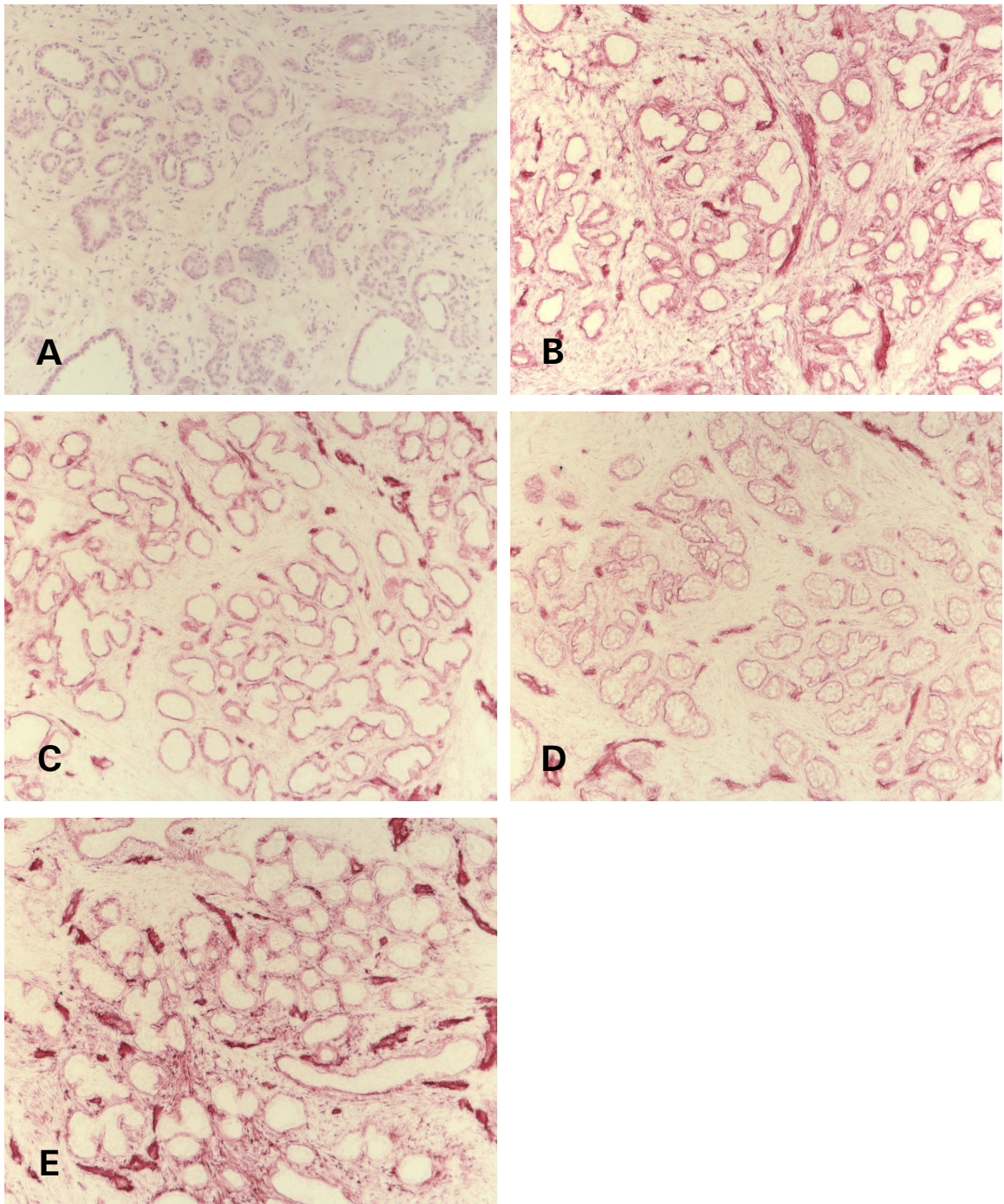
Überwiegend komplette erhaltene, fokale kurzstreckig unterbrochene Markierungsmuster der Basalmembranregion waren für die  $\alpha 2$ -Kette zu erzielen (Abbildung 6), einer der untersuchten Fälle war komplett negativ.

Die semiquantitativ ermittelten Ergebnisse sind in Tabelle 5 dargestellt.

**Tabelle 5: Semiquantitative Darstellung der Verteilung der einzelnen Lamininketten im Basalmembranbereich der proliferierenden tubulären Strukturen zum angrenzenden Stroma in sklerosierenden Adenosen.**

	$\alpha 5$	$\beta 1$	$\gamma 1$	$\beta 2$	$\alpha 2$	$\alpha 3$	$\gamma 2$
1	++++	+++	++++	++++	+++	++++	++++
2	++++	+++	++++	+++	Ø	++++	++++
3	++++	++++	++++	++++	++	++++	++++





**Abbildung: 6** Immunhistochemische Darstellung verschiedener Lamininketten im Basalmembranbereich von sklerosierenden Adenosen.

- A.** HE-Präparat (zum Vergleich, Vergrößerung 75fach).
- B.** Darstellung der  $\alpha 5$ -Kette durch den monoklonalen Antikörper 4C7 mit kräftiger kontinuierlicher Markierung der Basalmembranregion (Vergrößerung 75fach).
- C.** Darstellung der  $\beta 1$ -Kette durch den Antikörper 4E10 ohne Markierungsverluste im Basalmembranbereich (Vergrößerung 75fach).
- D.** Darstellung der  $\beta 2$ -Kette durch den Antikörper C4, neben einer ununterbrochenen Markierung im Basalmembranbereich auch strichförmige Zellgrenzdepositionen dieser Kette (Vergrößerung 75fach).
- E.** Verwaschene, fokal nicht sicher abgrenzbare Markierung der Basalmembranen der durch den Antikörper 5H2 dargestellten  $\alpha 2$ -Kette (Vergrößerung 75fach).

### 3.3. Verteilungsmuster der einzelnen Lamininketten in Fibroadenomen

In den beiden untersuchten Fibroadenomen konnte eine nahezu erhaltene Basalmembranmarkierung für die  $\alpha 3$ -,  $\alpha 5$ -,  $\beta 2$ -,  $\gamma 1$ - und  $\gamma 2$ -Ketten nachgewiesen werden (Abbildung 7).

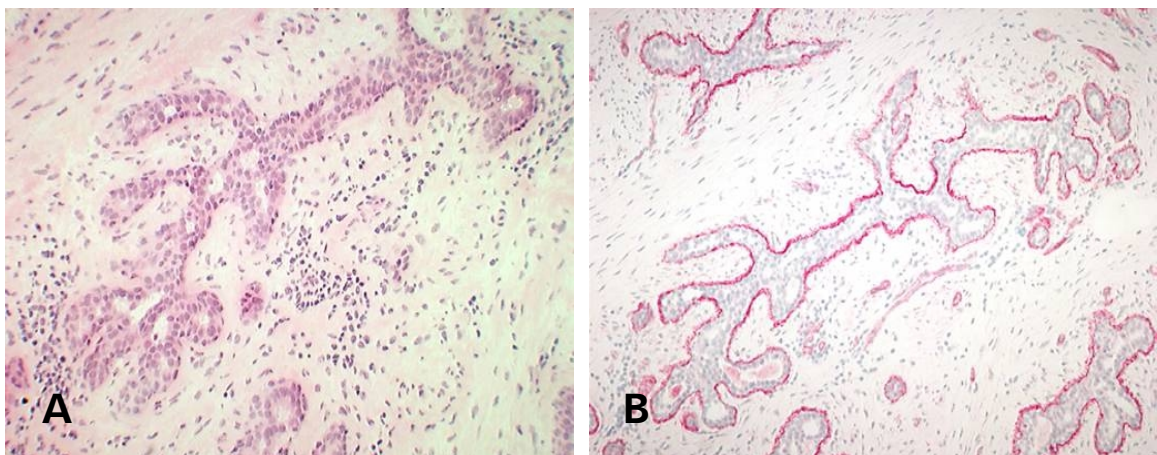
In einem Fall waren stärkere Abbrüche beziehungsweise Markierungsverluste für die  $\beta 1$ -Kette zu registrieren.

Deutliche Unterbrechungen der epithelialen Basalmembranmarkierung waren in beiden Fibroadenomen für die  $\alpha 2$ -Kette vorhanden.

Die semiquantitativen Ergebnisse sind in Tabelle 6 dargestellt.

**Tabelle 6: Semiquantitative Darstellung der Verteilung der einzelnen Lamininketten im Bereich der epithelialen Basalmembran in Fibroadenomen.**

	$\alpha 5$	$\beta 1$	$\gamma 1$	$\beta 2$	$\alpha 2$	$\alpha 3$	$\gamma 2$
1	+++	++	+++	+++	++	+++	++++
2	++++	++++	++++	++++	(+)	++++	++++



**Abbildung 7: Immunhistochemische Darstellung einer Lamininkette im Fibroadenom.**

**A. HE-Präparat (zum Vergleich, Vergrößerung 150fach).**

**B. Darstellung der  $\gamma 2$ -Kette von Laminin-5 durch den Antikörper GB3 mit kräftiger kontinuierlicher Markierung der Basalmembran (Vergrößerung 150fach).**

### 3.4. Verteilungsmuster der Lamininketten in benignen epithelial-proliferierenden duktafen Läsionen der Mamma

In der Basalmembran nichtmaligner intraduktal epithelial-proliferierender Erkrankungen der Mamma erfolgte ebenso wie in normalen adulten lobulären und duktafen Strukturen der immunhistochemische Nachweis der verschiedenen Lamininketten.

Eine kräftige, breite an den Rändern weich verlaufende Farbreaktion konnte für die  $\alpha 3$ -,  $\alpha 5$ -,  $\gamma 1$ - und  $\gamma 2$ -Ketten erzielt werden.

Die  $\beta 1$ -Kette stellte sich als weniger farbintensive, unscharf abgrenzbare, nahezu ununterbrochene Bandstruktur dar. Angedeutet waren auch die Zellgrenzen markiert.

Im Vergleich zu der Intensität der Expression der  $\beta 2$ -Kette der normalen adulten Epithelstrukturen der Mamma zeigten sich in den hier untersuchten epithelial-proliferierenden Läsionen deutliche Unterschiede. Zum einen war zu meist eine stärkere Farbreaktion erkennbar, die sich kontinuierlich in der Basalmembranregion darstellte. Daneben waren die Zellgrenzen deutlich positiv farbmarkiert. Fokal waren auch kleinherdige Unterbrechungen der Basalmembranmarkierung ersichtlich. Die semiquantitativen Ergebnisse sind aus Tabelle 7 zu entnehmen.

**Tabelle 7: Semiquantitative Darstellung der Verteilung der einzelnen Lamininketten im Basalmembranbereich der nichtatypischen intraduktalen Epithelhyperplasie der Mamma.**

	$\alpha 5$	$\beta 1$	$\gamma 1$	$\beta 2$	$\alpha 2$	$\alpha 3$	$\gamma 2$
1	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+	+	+

### 3.5. Verteilungsmuster der Lamininketten in der epithelialen Basalmembran nicht-invasiver duktaler Mammakarzinome

Bei der Bewertung der immunhistochemischen Darstellung der Lamininketten im Basalmembranbereich der in-situ Karzinome waren Unterschiede im Vergleich zu den nicht-karzinomatösen Läsionen zu registrieren. Die  $\alpha$ -5-,  $\beta$ 1- und  $\gamma$ 1-Ketten waren im Basalmembranbereich nachzuweisen, wobei die Markierung zumeist ununterbrochen zur Ansicht gelangte beziehungsweise die Verluste nie ausgedehnter als 50% ausfielen. Die  $\beta$ 2-Kette zeigte in den einzelnen untersuchten Tumorpräparaten bezüglich ihrer semiquantitativen Verteilung Differenzen, neben einer komplett erhaltenen Darstellung waren aber auch Markierungsverluste in über 50% der Basalmembranstrecken in einem Fall nachzuweisen. Daneben konnte abschnittsweise auch eine positive immunhistochemische Reaktion im Zellgrenzbereich aufgezeigt werden.

Defekte der Laminin-5-Ketten  $\alpha$ 3 und  $\gamma$ 2 waren in einem Teil der hier untersuchten Fälle vorhanden, es zeigen sich aber auch Karzinomabschnitte mit komplett erhaltener Basalmembranmarkierung.

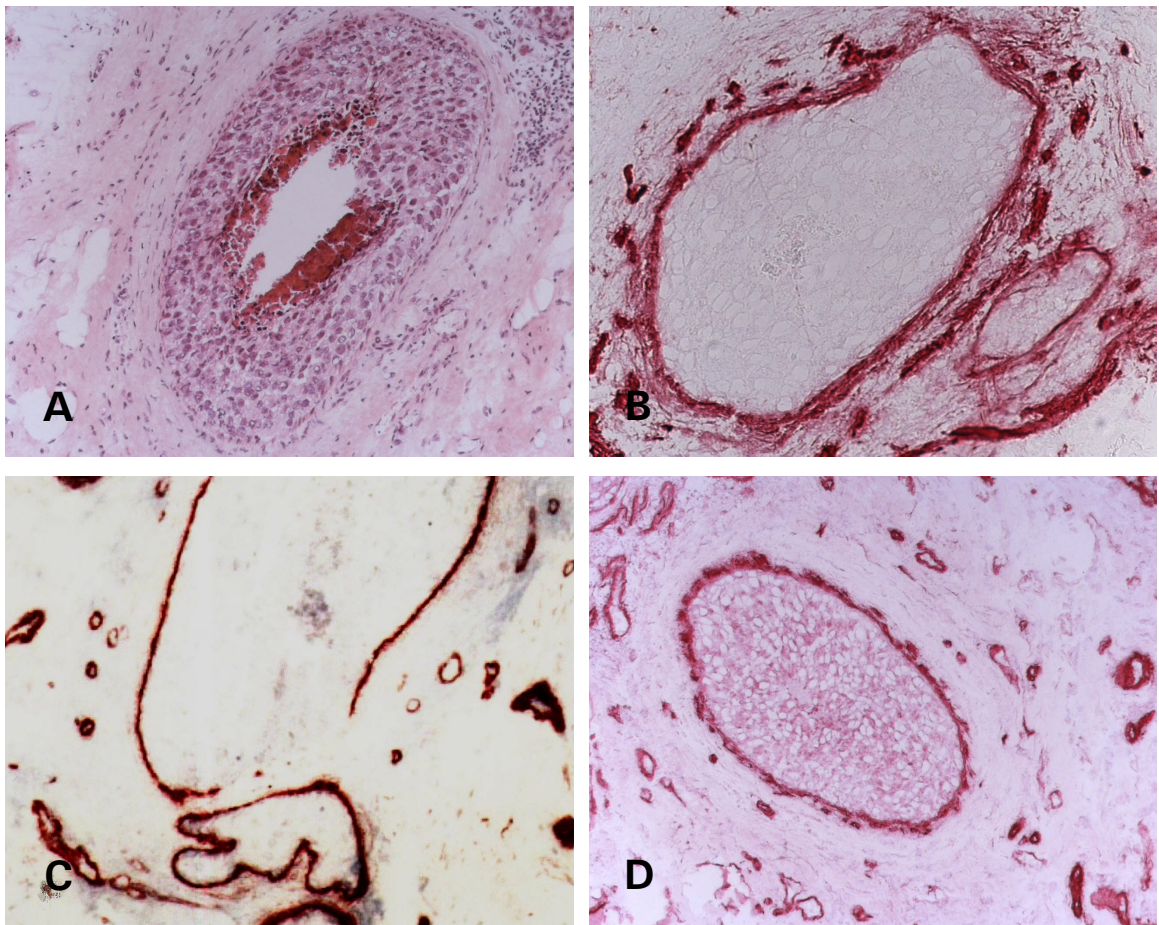
Deutliche Markierungsverluste waren für die  $\alpha$ 2-Kette zu registrieren, in keinem Fall war eine vollständige Basalmembranmarkierung zu registrieren.

Ergebnisdarstellung in Tabelle 8

**Tabelle 8: Semiquantitative Darstellung der Verteilung der einzelnen Lamininketten im Basalmembranbereich des karzinomatösen Epithels zum angrenzenden Stroma der in-situ Karzinome der Mamma.**

	$\alpha$ 5	$\beta$ 1	$\gamma$ 1	$\beta$ 2	$\alpha$ 2	$\alpha$ 3	$\gamma$ 2
1, G II	+++	+++	+++	+++	++	++++	++++
2, G II	+++	+++	++++	++	++	+++	+++
3, G II	++++	++++	++++	+++	+	+++	++++
4, G II	++++	++++	++++	+++	Ø	++++	+++
5, G II	++++	++++	++++	++++	+	++++	+++
6, G II	+++	+++	++++	+++	++	+++	++++
7, G II	++++	+++	++++	++++	++	++++	+++
8, G III	+++	++++	+++	+++	++	++	++
9, G III	+++	+++	++++	++++	++	+++	++





**Abbildung 8: Immunhistochemische Darstellung verschiedener Lamininketten im duktalem Carcinoma in situ.**

- A** HE-Präparat (zum Vergleich, Vergrößerung 150fach).
- B** Kontinuierliches Markierungsergebnis für die  $\alpha 3$ -Kette (Antikörper BM165) in der Basalmembranregion (Vergrößerung 150fach).
- C.** Darstellung der  $\gamma 2$ -Kette durch den Antikörper GB3 im Basalmembranbereich mit abschnittswiseen Verlusten der Markierung (Vergrößerung 150fach).
- 4.** Darstellung der  $\beta 2$ -Kette durch den Antikörper C4. Neben einer kontinuierlichen kräftigen Markierung in der Basalmembranregion auch Zellgrenzmarkierungen (Vergrößerung 150fach).

### **3.6. Verteilung der Lamininketten im Grenzbereich zwischen Tumorzellen und Stroma invasiv duktaler Karzinome der Mamma**

Der immunhistochemische Nachweis erfolgte für die Laminin  $\alpha 5$ -,  $\alpha 2$ -,  $\alpha 3$ -,  $\beta 1$ -,  $\beta 2$ -,  $\gamma 1$ -,  $\gamma 2$ -Ketten in der Basalmembranregion zwischen tumorösen Epithel und angrenzenden Stoma (Abbildung 9).

Es stellten sich dabei in allen Ketten nachweisbare, größtenteils sehr deutliche Defekte der Immunmarkierung dar, wobei jedoch zwischen den verschiedenen Präparaten Depositionsmusterdifferenzen vorhanden waren. (siehe Tabelle 9)

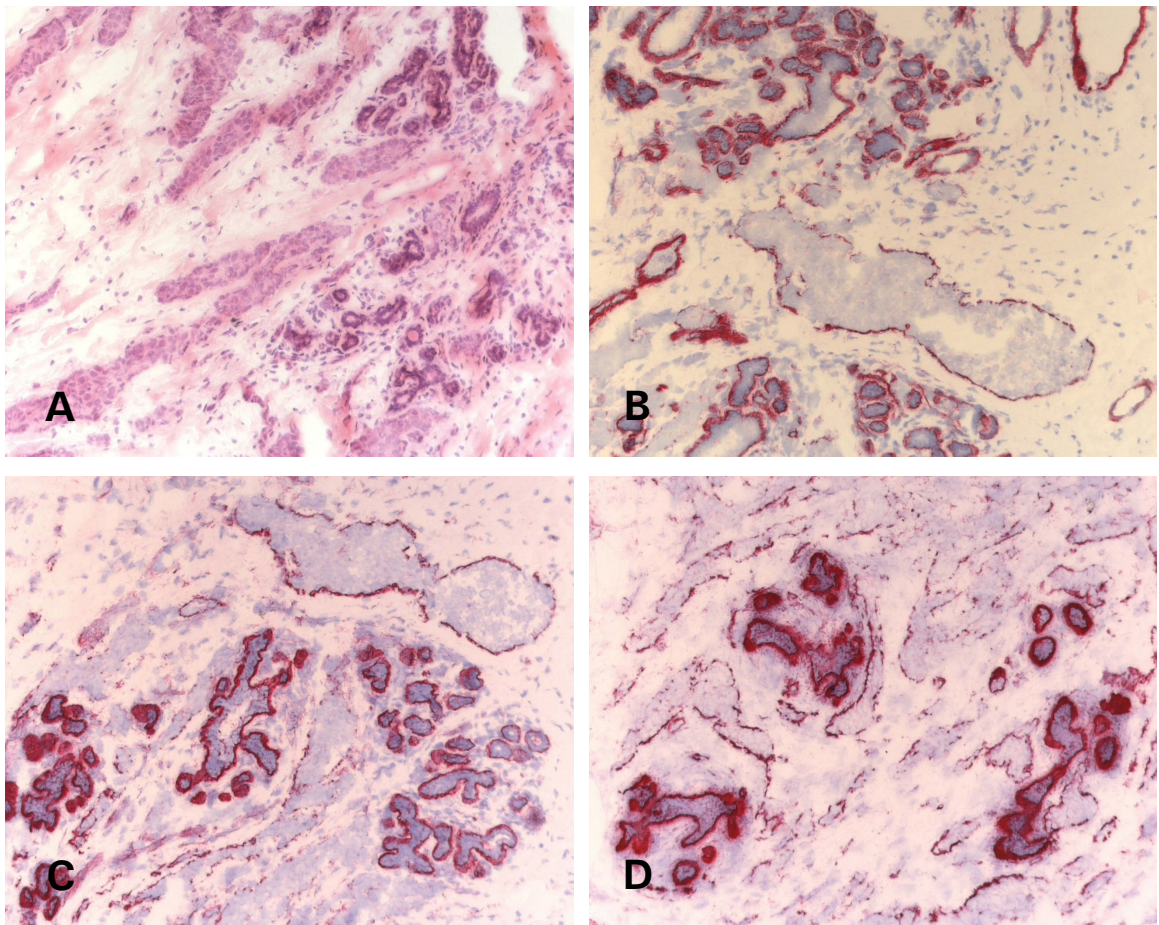
1. Die  $\beta 2$ -Kette zeigte zum Teil eine gleich intensive Markierung im Grenzbereich zwischen Tumorzellkomplexen und Tumorstroma als auch der Tumorzellgrenzen untereinander (Abbildung 10).
2. Für die  $\beta 2$ -, insbesondere jedoch für die  $\alpha 3$ - und  $\gamma 2$ -Ketten war in einigen Präparaten eine positive intranukleäre Farbreaktionen erkennbar, wobei aber keine Beziehung dieser zur Invasionsfront darstellbar war (Abbildung 11).
3. Für alle Ketten waren in verschiedenen Tumoren vollständige Markierungsverluste im Grenzbereich zwischen Tumorzellen und Stroma zu registrieren (Abbildung 12)
4. Die  $\alpha 2$ -Kette konnte im Vergleich zu anderen Lamininketten lediglich in schwacher Markierung und zumeist nur punktuell im invasiven Mammakarzinom nachgewiesen werden, zumeist war die Kette gar nicht mehr darstellbar.



5. Eine Korrelation zwischen Tumorgrading und semiquantitativen Ausmaß der Verluste konnte nicht aufgezeigt werden, hochgradige Verluste der einzelnen Lamininketten waren sowohl in mittelgradig als auch in schlecht differenzierten Karzinomen nachweisbar.
6. Vorbestehende duktale und lobuläre Strukturen zeigten erhaltene Basalmembranstrukturen und eine damit verbundene Lamininkettenexpression entsprechend den oben aufgeführten Ergebnissen der normalen adulten Mamma.

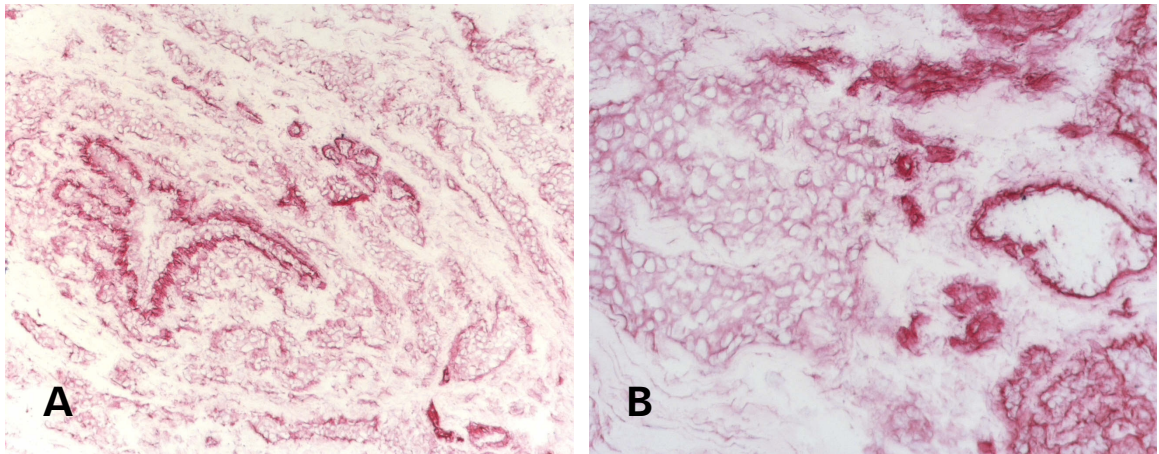
**Tabelle 9: Semiquantitative Darstellung der Verteilung der einzelnen Lamininketten im Grenzbereich des karzinomatösen Epithels von invasiv-duktalem Karzinomen zum Stroma.**

	$\alpha 5$	$\beta 1$	$\gamma 1$	$\beta 2$	$\alpha 2$	$\alpha 3$	$\gamma 2$
G II, pT1c	++	++	+	++	Ø	Ø	Ø
G II, pT1c	++	Ø	+	++	Ø	++	++
G II, pT1c	+	+	+	+	+	++	++
G II, pT1c	++	+	++	++	Ø	Ø	Ø
G II, pT1c	Ø	+	++	+	Ø	+	+
G II, pT1c	Ø	+	+	++	+	+	+++
G II, pT1c	+	Ø	++	+	Ø	Ø	Ø
G II, pT1c	Ø	++	Ø	+	Ø	++	++
G II, pT2	+	+	+	Ø	Ø	Ø	Ø
G II, pT2	+	Ø	++	Ø	+	+	+
G II, pT2	++	Ø	+	+	Ø	++	++
G II, pT2	Ø	++	Ø	+	Ø	Ø	Ø
G III, pT1c	Ø	Ø	++	++	+	+	Ø
G III, pT1c	+	+	Ø	++	Ø	++	++
G III, pT2	+	Ø	Ø	Ø	Ø	+	Ø
G III, pT4	Ø	Ø	+	+	Ø	Ø	Ø



**Abbildung 9: Immunhistochemische Darstellung verschiedener Lamininketten im Grenzbereich zwischen Tumorzellen und Stroma in invasiv-duktalem Karzinom**

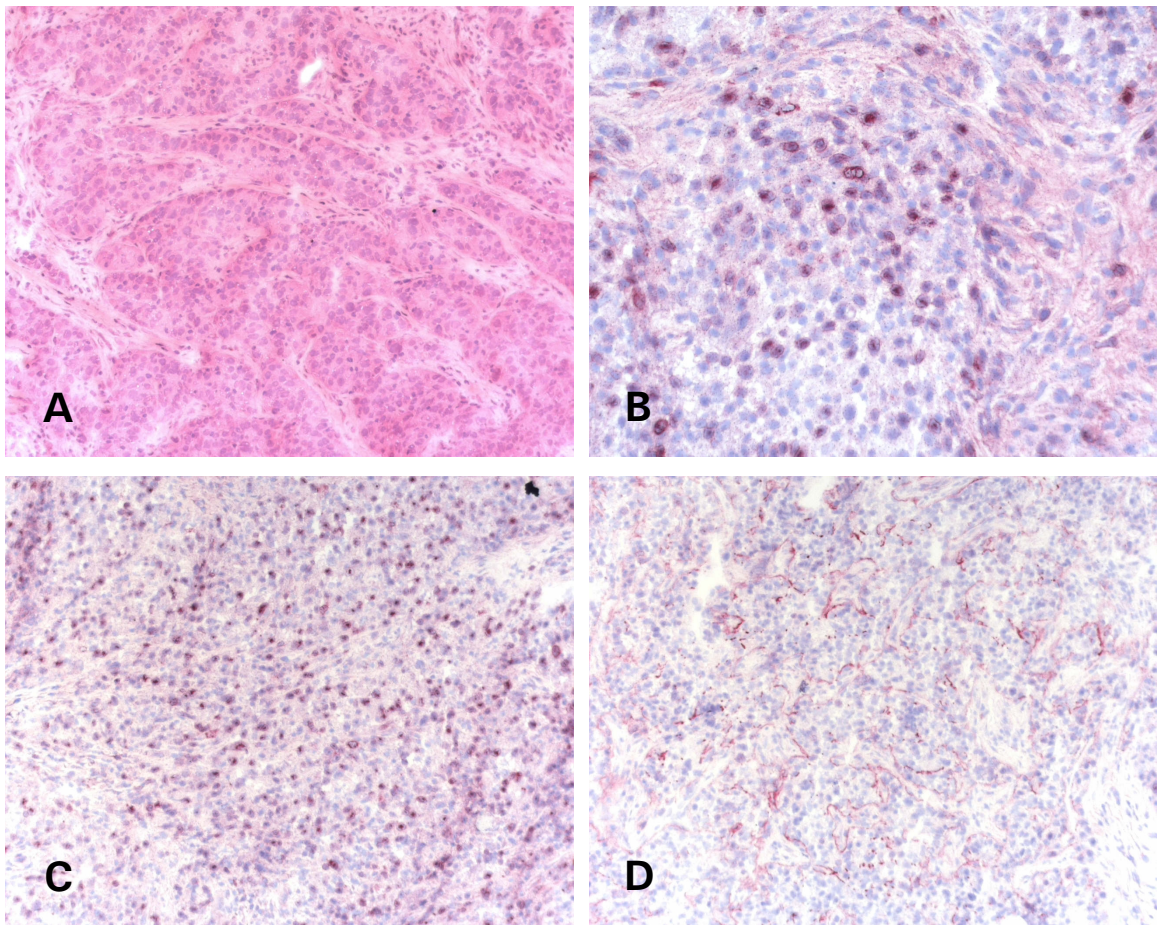
- A.** HE-Präparat (zum Vergleich Vergrößerung 150fach).
- B.** Darstellung der  $\beta 1$ -Kette durch den Antikörper 4E10 mit kontinuierlicher Markierung der vorbestehenden duktalen Strukturen und deutlichen Verlusten im Grenzbereich zwischen Tumorzellen und Stroma (Vergrößerung 150fach).
- C.** Deutlich differente Markierungsergebnisse zwischen vorbestehenden durchgängig angefärbten duktulären und lobulären Basalmembranen sowie infiltrierenden Tumorzellverbänden mit nur fleckförmiger Darstellung im Grenzbereich zwischen Tumorzellen und Stroma bei Einsatz des Antikörpers BM 165 gegen die  $\alpha 3$ -Kette (Vergrößerung 150fach).
- D.** Darstellung der  $\beta 2$ -Kette durch den Antikörper C4: Fleck- und strichförmige basalmembranartige Markierungen um Tumorzellen im Grenzbereich zum Stroma (Vergrößerung 150fach).



**Abbildung 10: Immunhistochemische Darstellung der  $\beta$ 2-Kette in invasiv-duktalem Karzinomen.**

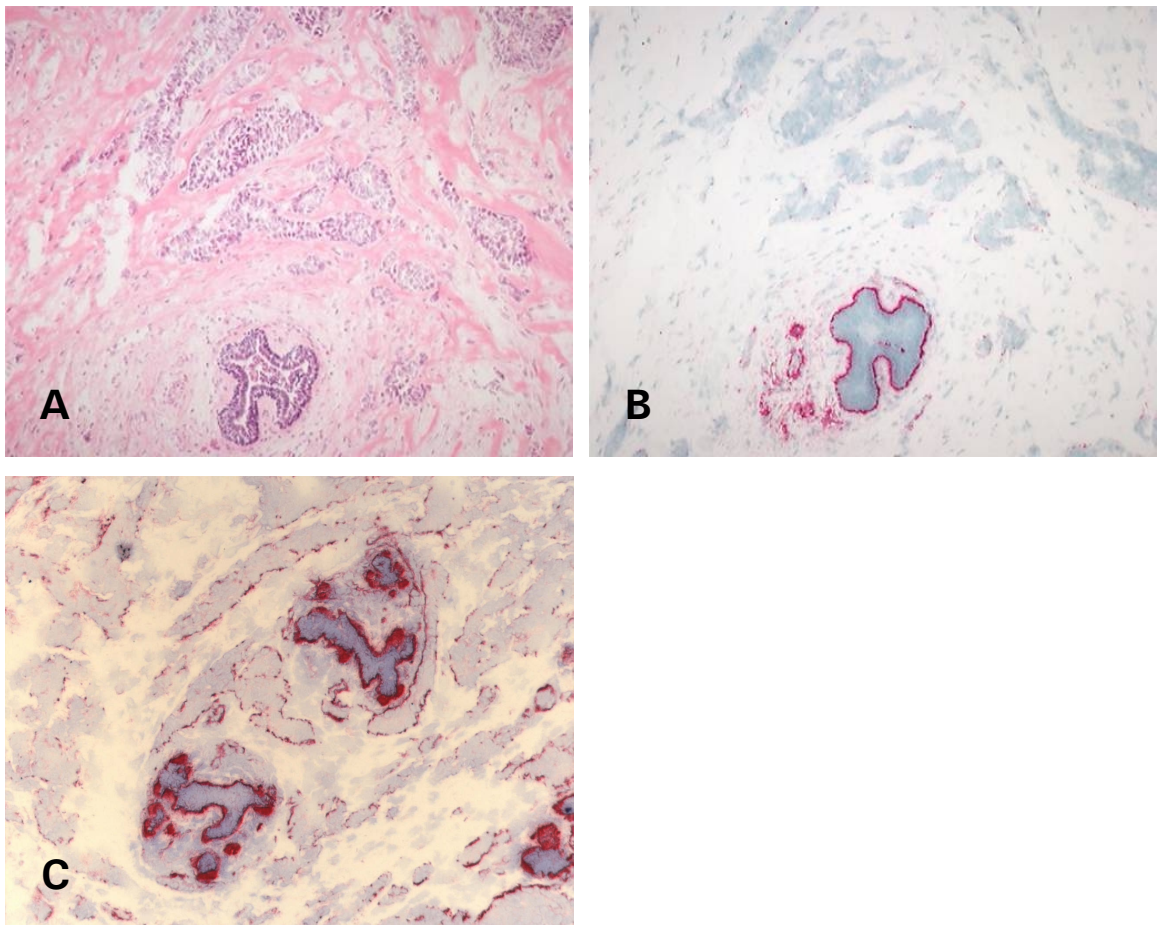
- A. Deutliches Markierungsergebnis im Basalmembranbereich vorbestehender Gangstrukturen. Die Tumorzellen weisen eine weniger farbintensive, verwaschene Farbmarkierung im Membranbereich auf (Vergrößerung 75fach).**
- B. Vergleichbare Befunde wie bei A. beschrieben (Vergrößerung 150fach).**





**Abbildung 11: Immunhistochemische Darstellung verschiedener Lamininketten in invasiv-duktalem Karzinom.**

- A. HE-Präparat (zum Vergleich Vergrößerung 150fach).**
- B. Ein Teil der invasiven Tumorzellen zeigt eine zellkernbezogene Markierung für die  $\gamma 2$ -Kette, dargestellt durch den Antikörper GB3. Eine basalmembranartige Markierung um Tumorzellen ist nicht zu belegen (Vergrößerung 150fach).**
- C. Unterschiedlich starke zellkernbezogene Markierung der invasiven Tumorzellen bei Einsatz des Antikörpers BM165 gegen die  $\alpha 3$ -Kette, eine Markierung im Grenzbereich zwischen Tumorzellen und Stroma lässt sich nicht erkennen (Vergrößerung 75fach).**
- D.  $\beta 2$ -Kette an anderer Stelle des gleichen Tumors, überwiegend strichförmige Markierung um Tumorzellen, einzelne Kerne sind zusätzlich angefärbt (Vergrößerung 75fach)**



**Abbildung 12: Immunhistochemische Darstellung verschiedener Lamininketten im Grenzbereich zwischen Tumorzellen und Stroma in invasiv-duktalem Karzinom.**

- A. HE-Präparat (zum Vergleich Vergrößerung 75fach).**
- B. Darstellung der  $\beta 1$ -Kette durch den Antikörper 4E10, vorbestehender Ductus mit deutlicher Reagibilität im Basalmembranbereich, invasive Tumorzellverbände mit komplettem Markierungsverlust (Vergrößerung 75fach).**
- C. Gleicher Tumor, Darstellung der  $\alpha 3$ -Kette durch den Antikörper BM165. Auch hier kräftig positive Immunreaktion im Basalmembranbereich vorbestehender Gänge, Tumorzellverbände mit unterbrochener strich- und fleckförmiger Markierung im Epithel-Stroma-Junktionsbereich (Vergrößerung 75fach).**

### 3.7. Verteilung der Lamininketten im Grenzbereich zwischen Tumorzellen und Stroma invasiv-lobulärer Karzinome

Auch in allen untersuchten Fällen der invasiv-lobulären Karzinome zeigten sich deutliche, ausgedehnte Verluste der einzelnen Lamininketten, die für einzelne Lamininketten zumeist stärker ausgeprägt waren als in invasiv-duktalem Karzinomen.

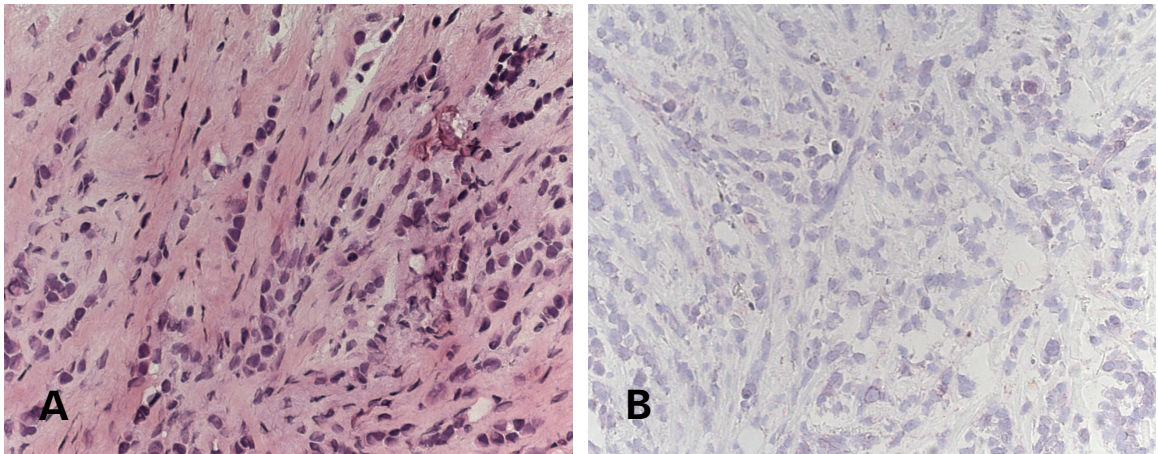
In keinem der untersuchten Karzinome konnte eine vollständig erhaltene Markierung der einzelnen Lamininketten registriert werden, die Verluste betrugen für alle Ketten stets mindestens 50%.

Die Abbrüche waren für alle Lamininketten in ähnlicher Intensität ausgeprägt, ausgedehntere Verluste in höhergradig malignen Karzinomen waren nicht nachweisbar (Tabelle 10, Abbildung 13).

**Tabelle 10: Ergebnisse der semiquantitativen Bewertung der Immunreaktion für die einzelnen Lamininketten in der Grenzregion von Tumorzellen zu Stroma in invasiv-lobulären Karzinomen.**

	$\alpha 5$	$\beta 1$	$\gamma 1$	$\beta 2$	$\alpha 2$	$\alpha 3$	$\gamma 2$
GII, pT1c	+	Ø	+	+	Ø	Ø	+
GII, pT1c	+	+	+	Ø	+	+	+
GII, pT1c	Ø	Ø	Ø	+	Ø	Ø	Ø
GII, pT1c	+	Ø	+	Ø	Ø	Ø	Ø
GII, pT1c	+	+	Ø	Ø	Ø	Ø	+
GII, pT1c	++	Ø	Ø	+	Ø	++	Ø
GII, pT2	+	Ø	Ø	+	+	Ø	+
GII, pT2	Ø	+	+	Ø	Ø	+	+
GII, pT2	+	+	+	Ø	Ø	Ø	Ø
GII, pT2	+	Ø	++	+	++	Ø	+
GII, pT3	+	+	+	++	+	+	+
GIII, pT1b	Ø	Ø	+	Ø	Ø	Ø	Ø
GIII, pT3	+	Ø	+	+	Ø	Ø	Ø





**Abbildung 13: Immunhistochemische Darstellung verschiedener Lamininketten im Grenzbereich zwischen Tumorzellen und Stroma in invasiv-duktalem Karzinom.**

**A. HE-Präparat (zum Vergleich, Vergrößerung 150fach).**

**B. Darstellung der  $\gamma$  2-Kette durch den Antikörper GB3. Nahezu komplett negatives Markierungsergebnis im Grenzbereich zwischen Tumorzellen und Stroma (Vergrößerung 150fach).**

## 4. Diskussion

### 4.1. Lamininketten als diagnostischer Marker

Die Basalmembran als spezialisierte Struktur der extrazellulären Matrix hat eine herausragende Funktion in der Regelung der Zell-Matrix-Interaktion, welche die epitheliale Zelldifferenzierung und -polarisierung entscheidend mitbeeinflusst.

Im Prozess der malignen Transformation und Invasion treten deutliche Veränderungen des Basalmembran-Metabolismus auf, die neben einer verstärkten Degradation auch eine Neusynthese von Basalmembranbestandteilen einschließt.

Aus diesem tumorbiologisch bekannten Wechselverhältnis von Funktion und Struktur eröffnete sich die Frage, inwieweit Laminin als quantitativ bedeutendstes Nicht-Kollagen-Protein der Basalmembran in den Prozess der Differenzierung, Proliferation und malignen Transformation einbezogen ist und welche qualitativen und quantitativen Veränderungen der einzelnen Lamininketten in den hier untersuchten epithelialen benignen und malignen Mammaläsionen auftreten.

### 4.2. Zur Wertigkeit des immunhistochemischen Nachweises der Lamininketten-Charakterisierung des Bindungsverhaltens der monoklonalen Antikörper gegen die einzelnen Lamininketten

Die Lamininisoformen können durch immunhistochemische Charakterisierung der Einzelketten oder durch Einzelketten-spezifische mRNA-in-situ-Hybridisierung dargestellt werden. Der immunhistochemische Nachweis wurde in der hier vorliegenden Untersuchung der in-situ-Hybridisierung vorgezogen, da



Moleküle in der extrazellulären Matrix demonstriert werden sollen und durch in-situ Hybridisierung nicht der Depositionsort, sondern der Synthesort nachgewiesen wird. Die immunhistochemische Untersuchungsmethode ist zudem auch durch eine geringere Fehlersequenz und eine günstigere Handhabung gekennzeichnet.

Die applizierten monoklonalen Antikörper sind zumeist mit der Erstbeschreibung von Lamininketten verbunden, so dass das Reaktionsmuster als repräsentativ für die entsprechenden Lamininketten anzusehen ist.

Da die Nomenklatur der Laminine und ihrer Ketten neu beschrieben wurde, die Anzahl der neu extrahierten Ketten ständig steigt und die Identität einiger Moleküle noch fraglich ist, muss das spezifische Bindungsverhalten diskutiert werden.

### **4.2.1. Bindungsverhalten der eingesetzten Antikörper 4E10 und 2E8 gegen die Laminin $\beta$ 1- und $\gamma$ 1-Ketten**

Der Antikörper gegen die  $\gamma$ 1-Kette 2E8 reagiert mit einem Epitop im Zentrum des Lamininmoleküls, wobei ein 200 kDa großes Peptid markiert wird (Wewer et al 1983, Engvall et al. 1986).

Durch den Antikörper 4E10 gegen die  $\beta$ 1-Kette wird ein 400 kDa schweres Peptid der globulären Domäne des langen Lamininmoleküls nachgewiesen (Wewer et al. 1993, 1994).

Diese beiden etablierten Antikörper sind vielfach angewandt wurden, ihre Spezifität ist akzeptiert.

### **4.2.2. Bindungsverhalten des monoklonalen Antikörpers 5H2 gegen die $\alpha$ 2-Kette und des Antikörpers C4 gegen die $\beta$ 2-Kette**

Der monoklonale Antikörper 5H2 markiert ein Epitop auf der 320kDa Kette von Laminin, welche der  $\alpha$ 2-Kette entspricht. Die Spezifität der Immunmarkierung mit dem Antikörper ist im Schrifttum generell anerkannt (Engvall et al. 1990).

Der monoklonale Antikörper C4 markiert die  $\beta 2$ -Kette, die Spezifität für diesen Marker ist ebenfalls akzeptiert (Hunter et al. 1989, Sanes et al. 1990).

### **4.2.3. Bindungsverhalten des monoklonalen Antikörpers BM165 gegen die Laminin $\alpha 3$ -Kette**

Durch den Antikörper BM165 wurde die  $\alpha 3$ -Kette nachgewiesen. Dieser Antikörper, der von Patricia Rousselle vorgestellt wurde, kennzeichnet spezifisch dermal-epidermale Junktionen der Haut, zeigte jedoch keine Reaktivität an Basalmembranen von Blutgefäßen und umliegenden Nerven. Das Auftreten von Immunmarkierungen korreliert mit dem Vorkommen von Hemidesmosomen und verankernden Filamenten in der Basalmembran. Subepitheliale Immunmarkierungen durch Antikörperreaktion mit BM 165 wurden in der Haut, der Trachea, dem Ösophagus, der Kornea, dem Amnion und geringen Ausmaßes auch der intestinalen glatten Muskulatur beschrieben. Keine Immunreaktionen konnten am Nierengewebe und Knorpel (Rousselle et al. 1991) sowie an nicht-epithelialen Basalmembranen (Markinovich et al. 1992) erzielt werden.

BM 165 markiert ein Epitop, welches in der Nähe der Molekülregion lokalisiert ist, die für die Bindung an Hemidesmosomen verantwortlich ist. BM165 kennzeichnet die 200kDa-Untereinheit (nach Prozessing 165 kDa) von Kalinin (entspricht der  $\alpha 3$ -Kette von Laminin5) und die 190 kDa Untereinheit von k-Laminin, sie entspricht der  $\alpha 3$ -Kette von Laminin-6 (Markinovich et al. 1992 und 1993; Rousselle und Aumailley 1994).

Es wird angenommen, dass die  $\alpha 3$ -Kette von Laminin-5 nicht identisch mit der  $\alpha$ -Kette von Laminin-6 ist (Galliano et al. 1995). Beide  $\alpha$ -Ketten, die  $\alpha$ -Kette von Laminin-5 (Kalinin) und von Laminin-6 (k-Laminin) werden durch den monoklonalen Antikörper BM165 markiert.

### **4.2.4. Bindungsverhalten des eingesetzten Antikörpers 4C7 gegen die $\alpha$ 5-Kette**

Gegen die  $\alpha$ 5-Kette wurde der monoklonale Antikörper 4C7 eingesetzt. Ursprünglich wurde dieser Antikörper der  $\alpha$ 1-Kette zugeordnet, um eine differente  $\alpha$ -Kette, zu der bis dahin lediglich bekannten  $\alpha$ 2-Kette, zu erkennen (Engvall et al. 1990). Die Spezifität des Antikörpers wurde erstmals durch Ekblom in Frage gestellt (Miner et al. 1995)

Der Antikörper 4C7 reagiert mit der globulären Domäne am Ende des langen Armes des Lamininmoleküls.

Der Antikörper 4C7 markiert die  $\alpha$ 5-Kette von Laminin-10 als auch von Laminin-11 (Tiger et al 1997). In mehreren bisherigen Studien konnte bislang eine ubiquitäre Verteilung dieser Kette nachgewiesen werden (Virtanen et al 1995, Durham and Snyder 1995, Durkin et al 1997, Kikkawa et al 1998, Miner et al. 1995).

### **4.2.5. Bindungsverhalten des monoklonalen Antikörpers GB3 gegen die Lamininkette $\gamma$ 2**

Die  $\gamma$ 2-Kette von Laminin wurde durch den Einsatz des monoklonalen Antikörpers GB3 dargestellt (Matsui et al. 1995). Dieser Antikörper wurde erstmalig von Yeh und Mitarbeitern (1986) vorgestellt und zur Diagnostik der Epidermiolysis bullosa hereditaria letalis (Herlitz) eingesetzt. Da die  $\alpha$ 3-Kette außer im Laminin-5-Molekül auch in Laminin-6 und Laminin-7 vorkommt, die  $\gamma$ 2-Kette jedoch ausschließlich als Isoform von Laminin-5 bekannt ist, sind Antikörper gegen diese Kette geeignet, selektiv Laminin-5 zu markieren. Die immunhistochemische Demonstration durch GB3 findet nur statt, wenn die  $\gamma$ 2-Kette mit der  $\beta$ 3-Kette kombiniert ist (Dimer) oder eine Heterotrimerbildung mit der  $\beta$ 3-Kette und der  $\alpha$ 3-Kette vorliegt. Die Laminin  $\gamma$ 2-Kette allein wird von dem Antikörper GB3 nicht erkannt (Matsui et al. 1995). Dieser Antikörper ist daher gut geeignet, das teilweise bzw. komplett zusammengela-

gerete Protein zu erkennen und Strukturveränderungen des Laminin-5 Moleküls im Prozess der malignen Transformation des Mammaepithels zu charakterisieren.

### **4.3. Korrelation der Lamininkettendeposition in der epithelialen Basalmembran der normalen adulten Mamma zu anderen drüsig differenzierten epithelialen Strukturen**

In der Literatur wurde über die Expression sowie die Deposition von Laminin und Kollagen IV in der Basalmembranregion des normalen adulten Epithels der Mamma sowie anderer drüsig differenzierter Gewebsstrukturen bereits mehrfach berichtet. Viele Untersuchungen beziehen sich jedoch auf die Darstellung des durch polyklonale Antikörper nachgewiesenen Lamininmoleküls. Stets stellte sich die epitheliale Basalmembran in der Mamma als kontinuierliches Band ohne Unterbrechungen oder Verdopplungen bei der immunhistochemischen Nachweisreaktion von Laminin dar (Böcker et al. 1992, Teil 1). Auch Gould und Mitarbeiter konnten zarte, lineare positive periduktale und perilobuläre Farbreaktionen von Laminin im Basalmembranbereich beschreiben (Gould et al. 1980). Auch der Einsatz monoklonaler Antikörper gegen verschiedene Lamininketten ( $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 3$ ,  $\gamma 1$  und  $\gamma 2$ ) zeigt eine kontinuierliche ununterbrochene Reagibilität der Basalmembran duktulären als auch azinären Epithels der Mamma (Määttä et al. 2001)

Entsprechend diesen Ergebnissen waren auch in den hier untersuchten adulten lobulären und dukталen Strukturen der Mamma die für die epithelialen Basalmembranen charakteristischen Lamininketten demonstrierbar.

Lichtmikroskopische Defekte der Lamininablagerung in der epithelialen Basalmembran der normalen lobulären und dukталen Strukturen der Mamma wurden weder in der Literatur beschrieben noch waren Abbrüche der epitheltypischen Lamininketten im vorliegenden Untersuchungsgut demonstrierbar.

In Übereinstimmung zu den Ergebnissen von Hewitt und Mitarbeitern (Hewitt et al. 1997) waren in den in dieser Arbeit untersuchten normalen adulten Mammagewebsproben die  $\alpha 5$ -,  $\beta 1$ -,  $\beta 2$  und  $\gamma 1$ -Ketten stets als kontinuierli-

che Farbreaktion der epithelialen duktaalen und lobulären Basalmembran in der adulten normalen Mamma vorhanden. In gleicher Arbeit konnte in normaler kolorektaler Schleimhaut ebenfalls eine kontinuierliche positive Immunmarkierung für die Lamininketten  $\alpha 5$ ,  $\beta 1$  und  $\gamma 1$  erzielt werden, wohingegen die  $\beta 2$ -Kette nicht und die  $\alpha 2$ -Kette nur minimal vorhanden war. Hewitt und Mitarbeiter benutzten zum Nachweis der einzelnen Lamininketten identische Antikörper entsprechend der hier vorliegenden Untersuchung.

Eine deutliche kräftige Farbreaktion ohne Abbrüche sowohl der lobulären als auch der duktaalen Basalmembranen konnte erwartungsgemäß für die  $\alpha 3$ -Kette erzielt werden, da diese Kette als wesentlicher Bestandteil der epithelialen Basalmembran bekannt ist (Markinovich et al. 1992).

Gleiche Beobachtungen waren im hier vorliegenden Untersuchungsgut für die  $\gamma 2$ -Kette möglich. Auch Yeh und Mitarbeiter wiesen den monoklonalen Antikörper GB3 als kontinuierliche Markierung mittels Immunfluoreszenz in der normalen adulten Mamma nach, wobei ihnen noch nicht bekannt war, dass es bei sich bei dem isolierten Antigen um die  $\gamma 2$ -Kette des Lamininmoleküls handelte (Yeh et al. 1986).

Nur einzelne Untersuchungen liegen in der Literatur bisher über die Verteilung der  $\alpha 2$ -Kette in der Mamma vor (Hewitt et al. 1997), weder in normalem adulten Mammaparenchym noch in den invasiven Karzinomen konnte diese Kette gefunden werden. Adultes normales Mammadrüsengewebe zeigte in der vorliegenden Untersuchung herdförmig betonte, unregelmäßige, schwache Markierungsmuster, wobei keine auffällige Affinität der Kette zu lobulären oder duktaalen Strukturelementen vorhanden war. In der humanen Speicheldrüse hingegen konnte eine positive Markierung der azinären Basalmembran für diese Kette und bei Doppelmarkierung mit dem muskelspezifischen Aktin HHF 35 eine Koloaliation der Myoepithelzellen nachgewiesen werden (Strassburger et al. 1998).

In der Magenschleimhaut war die  $\alpha 2$ -Kette auf die Basalmembran der Drüsen bzw. untere Abschnitte des Drüsengrundes beschränkt, eine Markierung des Oberflächenepithels lag nicht vor (Virtanen et al. 1995). Im Vergleich dazu stellte sich die  $\alpha 3$ -Kette in der Basalmembran des mukosalen Oberflächenepithels

pithels und der Hals- und Mittelstücke der Magendrüsen dar.

Für die  $\beta 1$ - und der  $\gamma 1$ -Ketten war eine gleichmäßige positive Immunfluoreszenzreaktion der Basalmembran der Drüsen als auch des Oberflächenepithels in allen untersuchten Magenabschnitten zu erzielen. Es lässt sich für die Magenschleimhaut somit ein enges Wechselverhältnis von zellulärer und glandulärer Differenzierung und Funktion einerseits und differenter Lamininkettenexpression als Ausdruck der Basalmembranheterogenität andererseits darstellen. Ein derart differentes Verteilungsmuster einzelner Lamininketten in Abhängigkeit vom Differenzierungstyp des Epithels war in der Mamma nicht zu belegen.

Insgesamt ordnen sich die dargestellten Lamininkettendepositionen der normalen adulten Mamma vergleichbar anderen drüsig differenzierten Epithelien in den Prozess des engen Wechselverhältnisses von erhaltener Basalmembran und regelrechtem Funktions- und Differenzierungszustand ein.

Laminine werden jedoch auch von nicht-epithelialen Zellen wie Fibroblasten, Endothelien, Muskelzellen und neuronalen Zellen synthetisiert. Ebenso konnte ein Nachweis verschiedener Lamininisoformen beziehungsweise deren mRNA in hämatopoetischen Zellen erzielt werden: Geberhiwot und Mitarbeitern (Geberhiwot et al. 2000) gelang mittels Polymerase-Ketten-Reaktion der Nachweis der mRNA-Sequenzen der Einzelketten von Laminin-8 ( $\alpha 4\beta 1\gamma 1$ ) in Megakaryozyten als auch Blutplättchen (Geberhiwot et al. 1999). Auch die  $\beta 2$ -Kette zeigte eine intrazytoplasmatische Verteilung in Megakaryozyten (Vogel et al. 1999). Dem Vorhandensein der einzelnen Lamininketten in den unreifen Vorstufen der Hämatopoese wird eine entscheidende Bedeutung für den Prozess der physiologischen Reifung und Differenzierung analog dem der epithelialen Zellen beigemessen. Es ist also davon auszugehen, dass bestimmte Lamininketten oder Heterotrimere auch in nicht-epithelialen Gewebe bzw. nicht-epithelial differenzierten Zellen notwendig für den Struktur- und Funktionserhalt sind.

### **4.4. Demonstration der Deposition der $\beta$ 2-Kette in benignen und malignen Läsionen der Mamma im Prozess der Proliferation und Dignitätsänderung**

Der regulierende Einfluss der Matrixkomponenten auf die Prozesse von Zelldifferenzierung und Proliferation wurde in verschiedenen in-vitro Untersuchungen mit embryonalen Zellsystemen erforscht. Die Matrixproteine können dabei auf den Prozess der Differenzierung negativ oder positiv einwirken. Während die adulte Matrix den Ist-Zustand des Gewebes unterstützt und stabilisiert sowie die einzelnen Kompartimente voneinander trennt, muss die embryonale Matrixkomposition der Flexibilität bezüglich der charakteristischen Gewebsumbauvorgänge Rechnung tragen. Im adulten Parenchym wird die Reexpression der in embryonalen Strukturen vorhandenen Matrixbestandteile sowohl in physiologischen als auch pathologischen Umbauzonen beobachtet und als provisorische extrazelluläre Matrix bezeichnet.

In verschiedenen Untersuchungen konnte die Korrelation der  $\beta$ 2-Kette zu embryonalen und proliferierenden Geweben aufgezeigt werden. So fand sich diese im Bereich embryonaler Basalmembranen im Endothel von Blutgefäßen und renalen Glomeruli (Sanes et al. 1990).

Während in fetalen Hautstrukturen die  $\beta$ 2-Kette in epidermalen und dermalen Zellen gefunden wird, kann in adultem Plattenepithel diese Kette nicht mehr nachgewiesen werden (Kosmehl et al. 1999).

Auch fetale Leberzellen zeigten starke Signale für die  $\beta$ 2-Kette, wohingegen die  $\beta$ 1-Kette nicht vorhanden war. In fetalem Lungengewebe waren beide erwähnte Ketten in Alveolarzellen und bronchialen Muskelzellen lokalisiert, die  $\beta$ 2-Kette konnte jedoch zusätzlich in bronchialen Epithelzellen aufgezeigt werden (Ivanainen et al. 1994).

Einen Austausch der Lamininketten in der Embryonalentwicklung konnten Virtanen und Mitarbeiter im Bereich der tubulären Basalmembran der Niere darstellen. Die  $\beta$ 2-Kette war nur während der frühen Parenchymdifferenzierung und damit verbundenen Kapillarschleifenentwicklung in der tubulären

Basalmembran existent, das adulte Nierengewebe wies hier bei völligem Verlust der  $\beta 2$ -Kette nur die  $\beta 1$ -Kette auf (Virtanan et al. 1995). Es ist somit von einer Proliferationsassoziation aktivierter Zellen bei Expression dieser Kette auszugehen.

Die Markierung der  $\beta 2$ -Kette in den hier untersuchten benignen Läsionen der Mamma ist auch mit einer verstärkten proliferativen Aktivität der epithelialen Strukturen assoziiert. Unsere Ergebnisse stehen in Übereinstimmung zu den Untersuchungen von Hewitt und Mitarbeitern (Hewitt et al. 1997), die die  $\beta 2$ -Kette als kontinuierliche Farbmarkierung in der Basalmembran sowohl der normalen adulten Mamma und in Fibroadenomen aufzeigten.

Als Ausdruck der proliferationsassoziierten Aktivierung dieser Kette kann die verbreiterte und farbintensivere Darstellung in den hier untersuchten benignen hyperplastischen Epithelläsionen gewertet werden. So zeigte sich auch in den hier dargestellten sklerosierenden Adenosen, zusätzlich zur Basalmembranmarkierung, eine, wenngleich etwas weniger kräftige, aber eindeutige Markierung der Zellgrenzen.

Partielle Differenzen bei vergleichender Betrachtung zu Ergebnissen des Schrifttums zeigten sich bezüglich der Darstellung dieser Kette in den Fällen infiltrierend wachsender Karzinome. In keinem der von Hewitt beschriebenen invasiven Mammakarzinome war die  $\beta 2$ -Kette nachweisbar, in unseren Untersuchungen war in einzelnen invasiven Karzinomen in unterschiedlicher Intensität und Ausprägung diese Kette erkennbar, insbesondere in invasiv-duktalem Karzinomen war herdförmig eine zellmembranassoziierte Anfärbbarkeit ersichtlich. Diese Beobachtung unterstützt die Aussage einer proliferationsassoziierten Deposition dieser Kette. Andererseits muss vor dem Hintergrund stärkergradiger Verluste dieser Kette in der Mehrzahl der untersuchten Karzinome von einer inversen Korrelation der  $\beta 2$ -Kette zum Prozess der Invasion ausgegangen werden. 1994 gelang es Wewer und Mitarbeitern (Wewer et al. 1994), die  $\beta 2$ -Kette in menschlichen kultivierten Karzinomzellen, unter anderem auch Mammakarzinomzellen, nachzuweisen. Sie schlussfolgerten, dass möglicherweise die intrazellulär synthetisierte Kette in invasiven Karzinomen also nicht in entsprechender Position im extrazellulären Matrixbereich



abgelagert werden kann. Eine sichere Einordnung dieser Kette hinsichtlich ihrer Bedeutung im Prozess der malignen proliferationsassoziierten De- und Entdifferenzierung kann derzeit nicht abschließend erfolgen, es wäre hier sicher die Untersuchung größerer Fallzahlen unter Einsatz immunhistologischer bzw. molekulopathologischer Untersuchungsmethoden notwendig, um die Ablagerung des Proteins mit der mRNA zu vergleichen und eventuell Rückschlüsse auf Differenzierungstyp oder Malignitätsgrad zu ziehen.

Weitere im Schrifttum aufgeführte Ergebnisse bezüglich des Verteilungsmusters dieser Kette in benignen und malignen epithelialen Läsionen unterschiedlichen Ursprungs kennzeichnen die gewebsabhängige Produktion und Sekretion der Lamininkette. Weder in regelrechter kolorektaler Schleimhaut und Adenomen noch in Kolonkarzinomgewebe gelang der Nachweis dieser Kette (Hewitt et al. 1997).

In hyperplastischem und dysplastischem oralen Plattenepithel war in Analogie zu unseren Beobachtungen eine gesteigerte Laminin  $\beta$ 2-Kettenexpression erkennbar entsprechend einer erhöhten proliferativen Aktivität des Epithels (Kosmehl et al 1999).

Eine Reexpression der  $\beta$ 2-Kette tritt in der Basalmembranzzone des nodulären Basalzellkarzinoms auf, wohingegen die adulte normale epidermale Basalmembran diese Kette nicht aufweist (Sollberg et al. 1992).

### **4.5 Der Laminin-5 Kettenverlust-ein Indikator der Malignität in Mammaläsionen**

#### **4.5.1. Laminin-5 als Teil des epithelialen Adhäsionskomplexes der Mamma**

Die Formation spezifischer Interaktionen zwischen Zelle und extrazellulärer Matrix ist notwendig für die Aufrechterhaltung der geweblichen Stabilität und des Funktionszustandes. Die Verankerung der epithelialen Zellen an die Basalmembran erfolgt durch spezielle transmembrane Zelladhäsionsmoleküle. Dieser für squamöse und komplex-differenzierte typische epitheliale Adhäsions-

onskomplex besteht aus den Hemidesmosomen und den aus der Basalmembran ragenden Ankerfilamenten (Lohi et al. 1998). Das entscheidende Strukturprotein der Ankerfilamente ist Laminin-5 (Rousselle et al. 1991). Auch für die Mamma konnte ebenso wie für andere drüsig differenzierte Epithelien dieser charakteristische Molekülkomplex aufgezeigt werden.

Durch Hemidesmosomen werden die Verbindungen zwischen dem Zytoskelett der Epithelzellen und der Basalmembran vermittelt (Borradori et al. 1996), wobei diese transmembranösen Multiproteinkomplexe aus einer inneren, äußeren und einer subbasalen Platte bestehen. Der innere Anteil dient als Ankerpunkt für die Intermediärfilamente Zytokeratin 5 und 14 (Markinovich et al 1993) und setzt sich aus den Proteinen HD1/ Plectin und BP 230 zusammen, die äußere Platte enthält das Integrin  $\alpha 6 \beta 4$  und BP180 (Nievers et al. 1999).

Antikörper gegen die Zytokeratine 5 und 14 zeigten deren Lokalisation in denen der Basallamina aufsitzenden myoepithelialen Zellen der normalen Brustdrüse als auch in den so genannten luminalen duktalem und lobulären Epithelien (Böcker et al 1992, Teil1).

Laminin-5 und BP 180 als Bestandteile der Ankerfilamente binden die Hemidesmosomen an die Ankerfibrillen. Baker und Mitarbeiter (Baker et al. 1996) konnten die wesentliche Rolle der G-Domäne der  $\alpha$ -Kette des Laminin-5 Moleküls für den Aufbau der Hemidesmosomen als auch deren Strukturerhalt aufzeigen.

Als Rezeptorligand von Laminin-5 wurde das Integrinmolekül  $\alpha 6 \beta 4$  charakterisiert (Niessen et al.1994, Spinardi et al. 1995).

Der Strukturerhalt des epithelialen Adhäsionskomplexes ist also notwendig für die Integrität und Stabilität des duktalem und lobulären Epithels als auch für die Aufrechterhaltung der Beziehung des Epithels zum angrenzenden Stroma. Störungen dieser Wechselbeziehung mit Verlust der Hemidesmosomen können durch eine gestörte Laminin-5 Expression sichtbar gemacht werden (Henning et al 1999).

### **4.5.2. Die funktionelle Bedeutung des epithelialen Adhäsionskomplexes unter besonderer Berücksichtigung von Laminin-5 für die Morphogenese und Karzinogenese der Mamma**

Wesentliche Strukturen und Proteine, die die mechanische und funktionelle Integration der Epithel- und damit auch der Karzinomzellen im Stroma vermitteln, sind Integrine, insbesondere  $\alpha 6 \beta 4$ , Kollagen VII und Laminin-5.

Für die normale Mamma konnte die Notwendigkeit des epithelialen Adhäsionskomplexes für den Prozess der Morphogenese herausgestellt werden, blockierende Antikörper gegen das Laminin-5 Molekül bzw. das Integrinmolekül  $\alpha 6 \beta 4$  in Mammazelllinien waren mit einem Verlust des Hemidesmosomenaufbaus verbunden (Bergstraesser et al. 1995, Stahl et al. 1997). In untersuchten Zelllinien waren keine differenzierten, in verzweigenden anastomosierenden Komplexen gelagerte Zellkomplexe zu erkennen. Die blockierenden Antikörper bewirkten eine Einzelzelllagerung oder ein Wachstum in multizellulären Clustern. Humane Mammakarzinomlinien waren durch eine alterierte Integrinexpression und damit eine gestörte Adhäsionsrezeptorstruktur charakterisiert (Bergstraesser et al. 1994). Der Verlust von Laminin-5 ordnet sich schlüssig in den Verlust anderer Adhäsionsmoleküle und die damit verbundene inhibierende Wirkung auf den Prozess der Differenzierung des normalen Drüsenepithels ein.

Auch der Prozess der malignen Transformation ist mit deutlichen Aufbaustörungen des epithelialen Adhäsionskomplexes verbunden. Während normales Mammarydrüsenepithel als auch Kulturen nichtneoplastischer Drüsenepithellinien in elektronenmikroskopischen Untersuchungen strukturerhaltene Hemidesmosomen aufwiesen, zeigten Epithelzellen intraduktaler maligner Läsionen nur dann erhaltene Hemidesmosomen, wenn sie Kontakt zur Basalmembran hatten (Bergstraesser et al. 1995). Mittels Immunfluoreszenz konnte jedoch gezeigt werden, dass hemidesmosomenassoziierte Proteine wie Mr 200 und die  $\beta 4$ -Integrinmolekülkette in nicht-invasiven malignen epithelialen Mammaläsionen nicht mehr vorhanden waren, so dass bereits zu diesem Zeitpunkt

von einer funktionellen Instabilität des Hemidesmosomenkomplexes und einer gestörten Interaktion zwischen Epithelzelle und Basalmembran auszugehen ist. Keine Hemidesmosomen konnten in invasiven epithelialen in vivo-Mammaläsionen gefunden werden (Bergstraesser et al. 1995).

Während in normalem, nichtneoplastischen Drüsenepithel mehrere untersuchte  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten des Integrinmoleküls immunhistochemisch demonstrierbar waren, kam es in invasiv-lobulären als auch invasiv-duktalem Karzinomen zu signifikanten Verlusten aller Molekülketten (Bergstraesser et al. 1994).

Tumorzellen, die partiell von einer extrazellulären Matrix mit nachweisbaren Laminin- und Kollagen IV-Depositen umgeben waren, wiesen hingegen eine positive Integrinkettenmarkierung auf (Damjanovich et al 1997).

Die Reduktion bzw. der komplette Verlust der Karzinomzell-Stroma-Adhäsion via Basalmembran durch Darstellung von Laminin-5 bzw. von einzelnen Ketten dieses Moleküls in den hier untersuchten invasiven Mammakarzinomen ist als generelles Prinzip der malignen Transformation des Mammaepithels einzuschätzen.

Neben den beschriebenen Strukturänderungen des epithelialen Adhäsionskomplexes als charakteristisches morphologisches Malignitätskriterium konnte auch dessen Rolle als Tumorprognosemarker herausgestellt werden. Eine statistisch signifikante Korrelation zwischen einem Verlust der Integrinmolekülketten im Primärtumor und der nodal-axillären Metastasierung in Mammakarzinomen ist Beleg hierfür (Gui et al 1997).

Die Verminderung der Expression von Integrinen, speziell des Integrinmoleküls  $\alpha 6 \beta 4$  und dessen Ligand Laminin-5 dürfte also nicht nur in Zusammenhang mit der Loslösung der malignen Zellen aus dem Primärtumor und dem Überwinden der Basalmembran, sondern auch mit dem Prozess der Metastasierung stehen.

Die Auflösung der Basalmembran-Hemidesmosomenbeziehung ist kein exklusives Merkmal des Mammakarzinoms, es wurde auch für andere Tumorentitäten beschrieben. Neben einer Assoziation zwischen dem Verlust des  $\alpha 6$ - und  $\beta 4$ -Integrinmoleküls und Basalmembranabbrüchen (Downer et al 1993)

im oralen Plattenepithelkarzinom ging mit geringerer Differenzierung der invasiven Regionen des Karzinoms eine deutliche Reduktion der Anzahl der  $\alpha 6$ - und  $\alpha 2\beta 1$ -positiven Zellen einher (Kosmehl et al. 1995).

### **4.5.3. Einordnung der differenten Laminin-5 Ketten-Expressionsmuster in verschiedenen Tumorentitäten**

Die Veränderungen der Laminin-5 Expression in malignen epithelialen Tumoren umfassen verschiedene Phänomene. Tumor- und gewebeabhängig kann entweder eine gesteigerte oder reduzierte Produktion dieses Proteins bzw. seiner Ketten durch die Tumorzellen erfolgen.

Für bestimmte Karzinome, wie das Kolon-, das Pankreasadenokarzinom, nichtkleinzellige Bronchialkarzinome und das orale Plattenepithelkarzinom konnten drei charakteristische Depositionsmuster herausgearbeitet werden (Kosmehl et al. 1999, Määttä et al. 1999, Tani et al. 1997, Soini et al. 1996)

1. Fokale Neudeposition bzw. Basalmembransegmenterhalt von Laminin-5-Ketten im Grenzbereich von Tumorzellen zu angrenzendem Tumorstroma neben Segmenten mit vollständigem Verlust in der Basalmembranregion.
2. Deposition von Laminin-5-Ketten im Tumorstroma in Nachbarschaft von invasiven Tumorzellkomplexen.
3. Zelluläre Retention im Zytoplasma invadierender Tumorzellen.

In Adenokarzinomen des Kolon stellte sich die m-RNA für die  $\gamma 2$ -Kette exklusiv in der Invasionszone des Tumors dar, schwächere Signale zeigten sich in benachbarten nichttumorösen Arealen sowie in Regionen mit entzündlichen oder degenerativen Veränderungen. Sehr geringe Markierungen wiesen normale Schleimhautanteile auf (Pyke et al. 1994). Die nahezu exklusive immunhistochemische Markierung der  $\gamma 2$ -Kette im Bereich der Invasionsfront wurde als morphologisches Korrelat eines besonders aggressiven Tumorverhaltens dieser Zellgruppen angenommen (Pyke et al. 1995).

Aus ihren Beobachtungen schlussfolgerten sie, dass die  $\gamma 2$ -Kette von Laminin-5 bevorzugt in invasiv-aktiven Karzinomzellen synthetisiert wird.

In Kolonadenomen zeigte sich eine intakte Basalmembran dysplastischer Drüsenkomplexe mit kontinuierlicher Darstellung der  $\alpha 3$ -Kette (Lohi et al. 2000) und  $\gamma 2$ -Kette, auch in gut bis mäßig differenzierten Adenokarzinomen war eine kontinuierliche Laminin-5 Darstellung in Umgebung neoplastischer Drüsenstrukturen zu erkennen (Sordat et al. 1998). Im Bereich der Invasionsfront hingegen aber auch in gering differenzierten Karzinomen zeigten sich Fragmentationen als auch vollständige Verluste des Laminin-5 Moleküls in Umgebung der Tumorzellkomplexe, mit zunehmendem Malignitätsgrad war hier eine zytoplasmatische Expression der  $\gamma 2$  als auch der  $\beta 3$ -Untereinheiten nachzuweisen. Die  $\alpha 3$ -Kette war intrazytoplasmatisch nur schwach nachweisbar. Des Weiteren waren die transmembranen Integrinmolekülketten  $\alpha 6$  und  $\beta 4$  in kontinuierlicher Markierung im Basalmembranbereich von Adenomen als auch im Grenzbereich von Kolonkarzinomzellen zum angrenzenden Stroma nachzuweisen (Lohi et al. 2000). Antikörper gegen Kollagen Typ VII hingegen verdeutlichten einen Verlust dieses Moleküls im Bereich der Invasionsfront in diesen Karzinomen. Die differenten Immunmarkierungen der invadierenden beziehungsweise dissoziierenden Tumorzellen weisen darauf hin, dass diese Tumorzellpopulation veränderte adhäsive Eigenschaften verbunden mit einer fokalen lokomotorischen Aktivität besitzen (Sordat et al. 1998).

Während im Zentrum gut differenzierter Magenkarzinome eine kontinuierliche und intensive periglanduläre Markierung für die  $\gamma 2$ -Kette vorlag, waren in weniger differenzierten Karzinomen deutliche Verluste der Zellmembranmarkierung nachzuweisen, zudem zeigte sich in schlecht differenzierten Karzinomen als auch im Bereich der Invasionsfront eine intrazytoplasmatische Markierung für diese Lamininkette. Die Tumorzellen der Invasionsfront ließen jedoch weder eine intrazytoplasmatische noch eine membrangebundene positive Immunreaktion für die  $\alpha 3$ -Kette bzw. die  $\beta 3$ -Kette erkennen (Koshikawa et al. 1999). Das isolierte Auftreten der  $\gamma 2$ -Kette im Bereich dissoziierender Zellen im Magenkarzinom könnte somit in enger Korrelation zu invasionsassoziierten proteolytischen Prozessen in dieser Tumorentität stehen.

Während mittels in-situ Hybridisierung in der normalen oralen Mukosa kein

positives Signal für die mRNA der  $\gamma 2$ -Kette erzielt werden konnte, gelang dies in Gewebeproben von einem Lichen planus als auch in stärkerer Intensität in dysplastischen Epithelien. In invasiven oralen Plattenepithelkarzinomen waren die stärksten Signale für diese Lamininkette exklusiv in malignen Zellen der Invasionsfront vorhanden (Kainulainen et al. 1997), wobei eine intrazytoplasmatische Lokalisation ebenso wie in Lymphknotenmetastasen dieser Tumore zu registrieren war. Schlussfolgernd war postuliert worden, dass diese isoliert auftretende Lamininkette bzw. das Gesamtmolekül Laminin-5 eine Leitschiene für die Proliferation und Migration der Tumorzellen in diesen Karzinomen bilden dürfte. Zu diskutieren ist in diesem Zusammenhang die Bedeutung der gesteigerten Expression bzw. Signalgebung der mRNA der  $\gamma 2$ -Kette oder des Proteins in dysplastischem oralen oder zervikalen Epithel. So gehen Schichtungsstörungen unterschiedlicher Graduierung metaplastischen Epithels der Cervix uteri mit differenten qualitativen zytoplasmatischen und/oder basalmembranassoziierten Markierungsergebnissen der  $\gamma 2$ -Kette einher, mit zunehmendem Dysplasiegrad war eine statistisch signifikant vermehrte Immunreaktion zu registrieren (Kohlberger et al 2003).

Anzunehmen ist, dass dysplastisches Epithel mit einer erhöhten mitotischen Aktivität und mit gesteigerter Stoffwechselaktivität vermehrt Basalmembranproteine synthetisiert, um damit eine Verstärkung der Epithelzell-Basalmembran-Adhäsion zu etablieren.

Haas (Haas et al. 2001) nutzte zur Bestimmung von Basalmembranproteinen die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie, um mittels detektierter Immunfluoreszenzsignale Differenzen zwischen normaler und hyperplastischer oraler Mukosa sowie oralen Plattenepithelkarzinomen quantitativ darzustellen. Während hyperplastische Mukosa eine erhöhte Immunfluoreszenzintensität erkennen ließ, zeigten orale Plattenepithelkarzinome in der Invasionszone eine signifikante Verminderung des Laminin-5-Gehaltes in den Basalmembranen. Die verminderte Deposition von Laminin-5 wurde somit als invasionsassoziiertes Phänomen gewertet.

Auch für Bronchialkarzinome sind Untersuchungsergebnisse bezüglich des Nachweises der  $\gamma 2$ -Kette in der Literatur verfügbar (Määttä et al. 1999): die

stärksten Markierungssignale wiesen Plattenepithelkarzinome, gefolgt von Adenokarzinomen und großzelligen Karzinomen auf. Nur ein Teil der kleinzelligen Karzinome zeigte eine positive Immunantwort für die  $\gamma 2$ -Kette im Stroma-Tumor-Grenzbereich. Eine Korrelation zwischen Tumorgroße, dem Auftreten nodaler Metastasen als auch der Überlebenszeit zur Intensität bzw. zum Ausmaß der  $\gamma 2$ -Kettendarstellung lag nicht vor, so dass dieser Kette in Bronchialkarzinomen zwar eine Bedeutung für die Expansion und Infiltration, nicht aber für die Prognose zukommt.

Diese Untersuchungsergebnisse mit einer vermehrten Ablagerung der  $\gamma 2$ -Kette in malignen invasiven epithelialen Läsionen unterscheiden sich grundsätzlich von den hier vorgestellten Beobachtungen in invasiven duktalem und lobulären Karzinomen und korrelieren damit zu den Ausführungen von Yeh und Mitarbeitern (Yeh et al 1986). Sie benutzten den Antikörper GB3 mittels Immunfluoreszenz, wobei ihnen lediglich bekannt war, dass er die epitheliale Basalmembran markiert, und konnten in keinem der invasiven Mammakarzinome ein positives Markierungsergebnis erzielen. Maligne intraduktale epitheliale Läsionen zeigten im Basalmembranbereich zwar ein kontinuierliches, jedoch schwaches Darstellungsmuster.

Vergleichbare Laminin-5-Markierungsmuster liegen für das Prostatakarzinom vor (Hao et al. 1996).

Somit unterscheiden sich diese Karzinome prinzipiell von den anderen bereits beschriebenen mit gesteigerter Kettenexpression, vor allem im Invasionsbereich.

In keinem der hier vorliegenden Präparate mit einer irregulär und diffus erkennbaren Kettendarstellung in Umgebung der invasiven Karzinomzellkomplexe war diese isoliert auf die Invasionsfront beschränkt, vielmehr lag eine schwache gleichmäßig über die Gewebeproben verteilte bzw. herdförmig akzentuierte  $\gamma 2$ -Kettenexpression mit ausgedehnten Verlusten vor. Auch die intranukleäre Deposition der  $\alpha 3$ -Kette und der  $\gamma 2$ -Kette in den hier untersuchten Mammakarzinomen wies keine räumliche Beziehung zur Invasionsfront auf. Ursächlich ungeklärt sind diese räumlich differenten Ablagerungen der Einzelketten. Anzunehmen ist, dass Tumorzellen mit einer intranukleären Pro-



teinmarkierung einen spezifischen Molekültransport und -depositionsmodus besitzen. Eine Korrelation zu Differenzierungsgrad oder Grading der invasiven Karzinome war aber nicht erkennbar, so dass an den hier untersuchten Fallzahlen eine Aussage zur biologischen Wertigkeit dieses Phänomens nicht möglich ist. Im Gegensatz dazu bestand eine Korrelation zwischen Differenzierungsrichtung und Markierungsergebnis im Zellmembranbereich bzw. im Grenzzonenbereich zwischen Stoma und epithelialer Komponente. In invasiv-lobulären Karzinomen waren deutlich weniger Markierungsergebnisse zu erzielen als in duktal differenzierten malignen Läsionen.

In Prostatakarzinomen geht ein Verlust des Laminin-5 Gesamtmoleküls mit fehlender Hemidesmosomenformation einher (Nagle et al. 1995). Insofern zeigen das Prostataparenchym und das organotypische glanduläre Karzinom der Mamma bezüglich des immunhistochemischen Nachweises von Laminin-5 eine Übereinstimmung. Bei erhaltener Expression der  $\alpha 3$ -Kette wiesen die  $\beta 3$ -Kette und die  $\gamma 2$ -Kette im Prostatakarzinom vollständige Verluste im Bereich der Tumorzellkomplexe auf. Eine erhöhte Konzentration der  $\gamma 2$  RNA in Zellen des invasiven Prostatakarzinoms korreliert nicht mit der Expression des translationierten Moleküls. Die Kontrollmechanismen der Regulation des Laminin-5-Genes sind bislang nicht hinreichend geklärt, es existieren jedoch Erklärungsvorschläge. Neben der Möglichkeit einer fehlenden Translation der RNA-Information wird diskutiert, dass die Proteinsynthese zwar erfolgt, aufgrund der Unfähigkeit der Zellen stabile Molekülkomplexe unter Integration der Lamininmolekülkette aufzubauen, Abbauvorgänge des Moleküls einsetzen (Hao et al. 1996). Auch für das Mammakarzinom erscheinen diese Prozesse möglich.

Verminderungen bzw. der Verlust der Laminin-5 Expression und die damit verbundene Hemidesmosomenaufbaustörung führen zu der therapeutischen Überlegung mit dem Ziel, die Stabilität des Laminin-5 abhängigen epithelialen Adhäsionskomplexes zu festigen, um den Prozess der Invasion und Tumorzellmigration zu inhibieren.

### 4.5.4. Laminin-5 als Marker der Dignitätsbestimmung in epithelialen

#### Mammaläsionen

Die normalen duktaalen und lobulären Strukturen der Mamma bestehen aus einer inneren luminalen Epithelzelllage und einer äußeren der Basallamina aufsitzenden Myoepithelzelllage. Die Luminalzelllage und die Myoepithelzelllage differieren in Morphologie, Ultrastruktur und der Expression spezifischer Marker. Während die luminalen Zellen epitheliale Membranantigene und Zytokeratine (CK) wie CK 7, 8, 18 und 19 aufweisen, exprimieren die Myoepithelzellen muskelspezifische Antigene (z.B. ASMA) und die Zytokeratine 5 und 14 (Guelstein et al. 1993). Boecker und Mitarbeiter (Boecker et al. 2001) gingen der oft gestellten Frage nach, ob benigne epithelial-proliferative Mammaläsionen als direkter Präkursor des nicht-invasiven als auch des invasiven Mammakarzinoms angesehen werden können, indem sie die Immunreaktivität der basalen Zelllage der benignen intraduktalen epithelialen Läsionen für Zytokeratin 5/6 mit DCIS-Fällen verglichen und dazu mittels vergleichender Genomhybridisierung mögliche Abberationen korrelierten. Alle untersuchten nicht-atypischen intraduktalen Hyperplasien, Papillome, tubulären Adenome und Adenosen wiesen eine CK 5/6-positive Basalzelllage auf, wohingegen die meisten niedrigmalignen und alle hochmalignen in-situ-Karzinome dieses Markierungsergebnis vermissen ließen. Die nicht-neoplastischen epithelialen Läsionen wiesen keine chromosomale Abberation auf, die in-situ Karzinome zeigten chromosomale Gewinne und Verluste.

Ein gemeinsames Merkmal der invasiven und metastasierenden Mammakarzinome und aller anderen Karzinome ist die Fragmentation und der Verlust der Basalmembran (Barsky et al. 1983, Charpin et al. 1986).

Bezüglich der prognostischen Einordnung und entsprechender therapeutischer Konsequenzen invasiver Mammakarzinome existieren zahlreiche anerkannte morphologische Marker (nodale Metastasierung, Hormonrezeptorstatus, Nachweis von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen), daneben existieren zahlreiche so genannte „neue“ Prognosemarker, die morphologische, mo-

lekulargenetische und molekularbiologische Aspekte umfassen, die jedoch bezüglich ihres Einflusses auf das rezidiv- beziehungsweise metastasenfreie und/oder Überleben allgemein noch nicht genügend abgesichert sind.

Es liegen bislang keine Untersuchungsergebnisse zum Nachweis des Verlustes von Laminin-5 als morphologisches Korrelat der Gewebsstrukturstörung und der frühen Invasion im Mammakarzinom vor. Gerade die Differenzierung zwischen nicht-infiltrierendem und invasivem Wachstum von neoplastischen Zellen als Schwerpunkt in der diagnostischen Pathologie ist jedoch entscheidend für das therapeutische Vorgehen und das prognostische Verhalten. In den hier vorgestellten Ergebnissen konnte eine eindeutige Korrelation zwischen Invasion und Verlust der einzelnen Ketten von Laminin-5 aufgezeigt werden. Darüber hinaus wiesen aber auch konventionell-lichtmikroskopisch nicht-invasive Karzinome abschnittsweise bereits Verluste von Einzelketten des Laminin-5-Moleküls und damit Strukturstörungen des epithelialen Adhäsionskomplexes auf. Es ist also anzunehmen, dass bereits Strukturstörungen der Basalmembranintegrität vorhanden sind, die den lichtmikroskopisch fassbaren invasiven Prozessen vorausgehen und somit der Verlust beziehungsweise Abbrüche der Einzelketten des Laminin-5 Moleküls als möglicher früher Marker der beginnenden Invasion anzusehen sind. Weiterer Abklärung bedarf, in welcher Phase der Differenzierungsstörung beziehungsweise auf welcher Stufe im Prozess der malignen Transformation die Dysorganisation dieses Basalmembranmoleküls auftritt.

Im Vergleich dazu ist die Korrelation der  $\beta$ 2-Kette zur proliferationsassoziierten Aktivierung und Dedifferenzierung in benignen und malignen Mammaläsionen zweifelsohne ein interessantes Phänomen, zeigt aber keine diagnostische Relevanz bezüglich der Dignitätsbestimmung.

### Zusammenfassung

Die extrazelluläre Matrix wird von den strukturbildenden Proteinen des Extrazellularraumes gebildet. Die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix sowie die zelluläre Differenzierung und Funktion stehen in einem engen Wechselverhältnis. Während die Zelle eine für sie spezielle Matrix synthetisiert, ist diese Matrix wiederum Voraussetzung für die Funktion und spezifische Differenzierung der Zelle. Auf Grund der strukturellen Einbindung ist der Wachstumsfaktor Matrix mit grundlegenden langfristigen Funktions- und Differenzierungszuständen der Zelle verbunden. Die Basalmembran ist die komplexe spezialisierte Organisationsform der extrazellulären Matrixmoleküle. Wesentlicher Bestandteil der Basalmembran sind die Laminine.

Laminin-5 ( $\alpha 3\beta 3\gamma 2$ ) stellt dabei das Schlüsselprotein der Ankerfilamente dar. Diese verbinden die Basalmembran mit den Hemidesmosomen und bilden den epithelialen Adhäsionskomplex.

Ziel der vorliegenden Studie ist die immunhistochemische Analyse der geweblichen Verteilung ausgewählter Lamininketten mittels kettenspezifischer monoklonaler Antikörper in Bezug auf das epitheliale Kompartiment in der normalen adulten weiblichen Mamma als auch in benignen und malignen Läsionen unter besonderer Berücksichtigung von Laminin-5 als Bestandteil des epithelialen Adhäsionskomplexes und als Marker der Dignitätsänderung.

In 52 Mammagewebspräparaten wurden mittels APAAP-Technik die Ketten  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\gamma 1$  und  $\gamma 2$  dargestellt und semiquantitativ bewertet.

In der normalen adulten Mamma war eine kontinuierliche Markierung der lobulären und duktaalen epithelialen Basalmembran für die einzelnen Lamininketten nachzuweisen. Auch für die  $\alpha 2$ -Kette war eine positive Markierung zu registrieren. Kontinuierliche Farbreaktionen der einzelnen Ketten, insbesondere für  $\alpha 3$  und  $\gamma 2$ , wiesen auch die benignen epithelialen Läsionen im Basalmembranbereich auf.

Das duktaale Carcinoma in-situ zeigt für die einzelnen Ketten kleinherdige Ab-

brüche der Markierung im Basalmembranbereich, für die  $\alpha 2$ -Kette waren die Abbrüche flächenhaft und stets über 50% der Basalmembranstrecke. Bemerkenswert war das Phänomen, dass in-situ-Neoplasien bereits fokale Verluste der  $\alpha 3$ - und  $\gamma 2$ -Ketten aufwiesen, ohne dass sich konventionell-histologisch Hinweise auf eine beginnende Invasion ergaben.

Im Vergleich von DCIS ist in invasiv-duktalem Karzinomen eine Steigerung der Lamininkettenverluste in der Epithel-Stroma-Kontaktzone bis hin zum kompletten Verlust nachweisbar. Von dem Verlust sind regelmäßig die Ketten des Laminin-5-Moleküls  $\alpha 3$  und  $\gamma 2$  und besonders stark auch die  $\alpha 2$ -Kette betroffen. Der großflächige bis komplette Verlust von Ketten des Laminin-5 ist von hoher diagnostischer Signifikanz: Die Laminin-5 spezifische  $\gamma 2$ -Kette ist in der normalen Mamma und in den benignen epithelialen Läsionen der Mamma darstellbar, kann im DCIS eine maligne Transformation aufzeigen und ist in invasiv-duktalem und noch stärker in invasiv-lobulärem Karzinomen flächenhaft reduziert bzw. fehlt vollständig. Eine Beziehung zum Grading der invasiven Karzinome konnte nicht aufgezeigt werden.

Das Mammakarzinom zeigt ausschließlich das Phänomen des Laminin-5-Verlustes und unterscheidet sich so von anderen Karzinomen. Offensichtlich hat Laminin-5 eine differente Bedeutung für die Invasion von Karzinomen. Für Karzinomtypen mit einer Laminin-5 Stromadeposition wurde diese Laminin-isoform als Leitschiene für die Invasion vorgeschlagen. Für das Mammakarzinom trifft diese Laminin-5 Funktion nicht zu.

Der fokale Verlust von den Lamininketten  $\alpha 3$  und  $\gamma 2$  in der Basalmembran von in-situ-Neoplasien ist als vollzogene Strukturstörung des epithelialen Adhäsionskomplexes und als möglicher früher Indikator einer beginnenden Invasion anzusehen.

Die vorliegende Arbeit charakterisiert somit die dignitätsentscheidende Bedeutung des epithelialen Adhäsionskomplexes mittels der Darstellung des Laminin-5-Moleküls im Basalmembranbereich epithelialer Läsionen der Mamma.

## Literaturverzeichnis

1. Aberdam D, Galliano MF, Vailly J, Pulkkinene L, Bonifas J, Christiano AM, Trygvason K, Uitto J, Epstein JrEH, Ortonne JP, Meneguzzi G **1994**. Herlitz`s junctional epidermolysis bullosa is genetically linked to mutations in the gene for the  $\gamma 2$  subunit of nicein/kalinin (laminin-5). *Nat Genet*, 6:299-304
2. Abrahamson DR **1986**. Recent studies on the structure and pathology of basement membranes. *J. Pathol*, 149:257-278
3. Adams JC, Watt FM **1993**. Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix. *Development*, 117:1183-1192
4. Albeda SM, Buck CA **1990**. Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB J*, 4:1868-2880
5. Albrechtsen R, Nielsen M, Wewer U, Engvall E, Rusholati E **1981**. Basement membranes changes in breast cancer detected by immunohistochemical staining for laminin. *Cancer Research*, 41:5076-5081
6. Arihiro K, Inai K, Kurihara K, Takeda S, Kaneko M **1993**. Distribution of laminin, typeIV collagen and fibronectin in the invasive component of breast carcinoma. *Acta Pathol Jap*, 43:758-764
7. Ashkens J, Muschler J, Bissell MJ **1996**. The extracellular matrix in epithelial biology: shared molecules and ommon themes in distant phyla. *Dev Biol*, 180:433-444
8. Aumailley M, Smyth N **1998**. The role of laminins in basement membrane function. *J Anat*, 193:1-21
9. Baker SE, Hopkinson SB, Fitchmun M, Andreason GL, Frasier F, Plopper G, Quaranta V, Jones JCR **1996**. Laminin-5 and hemidesmosomes: role of the  $\alpha 3$  chain subunit in hemidesmosome stability and assembly. *J Cell Science*, 109:2509-2520

10. Barsky SH, Siegal GP, Jannotta F, Liotta LA **1983**. Loss of basement membrane components by invasive tumors but not by their benign counterparts. *Lab Invest*, 49:140-147
11. Beck K, Hunter I, Engel J **1990**. Structure and function of laminin: anatomy of a multidomain glycoprotein. *The FASEB Journal*, 4:148-160
12. Berdichevsky F, Gilbert C, Shearer M, Taylor-Papadimitriou J **1992**. Collagen-induced rapid morphogenesis of human mammary epithelial cells: the role of the  $\alpha 2\beta 1$  integrin. *J Cell Sci*, 102:437-446
13. Bergstraesser LM, Weitzman SA **1994**. Alterations in integrin and basement membrane protein expression by malignant breast cells. *Int J Oncol*, 4:915-930
14. Bergstraesser LM, Srinivasan G, Jones JCR, Stahl S, Weitzman SA **1995**. Expression of hemidesmosomes and component proteins is lost by invasive breast cancer cells. *Am J Pathol*, 147:1823-1839
15. Bergstraesser LM, Weitzman SA **1993**. Culture of normal and malignant primary human mammary epithelial cells in a physiological manner simulates in vivo growth patterns and allows discrimination of cell type. *Cancer Res*, 53:2644-2654
16. Bernier SM, Utani A, Sugiyama S, Doi T, Polistina C, Yamada Y **1994**. Cloning and expression of laminin  $\alpha 2$ -chain (M-chain) in the mouse. *Matrix Biol*, 14:447-455
17. Birembaut P, Caron Y, van Cauwen D, Foidart JM **1983**. Distribution of laminin, a basement membrane glycoprotein, in epithelial proliferations. *Collagen Rel Res*, 3:25-31
18. Bissell MJ, Ram TG **1989**. Regulation of functional cytodifferentiation and histogenesis in mammary epithelial cells: role of the extracellular matrix. *Environ Health Persp*, 80:61-70
19. Blum JL, Zeigler ME, Wicha MS **1989**. Regulation of mammary differentiation by extracellular matrix. *Environ Health Persp*, 80:71-83

20. Böcker W, Bier B, Freytag G, Brömmelkamp B, Jarasch ED, Edel G, Dockhorn-Dworniczak B, Schmid KW **1992**. An immunohistochemical study of the breast using antibodies to basal and luminal keratins,  $\alpha$ -smooth muscle actin, vimentin, collagen and laminin. Part II: epitheliosis and ductal carcinoma in situ. *Virchows Archiv A Pathol Anat*, 421:323-330
21. Böcker W, Bier B, Freytag G, Brömmelkamp B, Jarasch ED, Edel G, Dockhorn-Dworniczak B, Schmid KW **1992**. An immunohistochemical study of the breast using antibodies to basal and luminal keratins,  $\alpha$ -smooth muscle actin, vimentin, collagen and laminin. Part I: normal breast and benign proliferative lesions. *Virchows Archiv A Pathol Anat*, 421:315-322
22. Boecker W, Buerger H, Schmitz K, Ellis IA, Diest PJ, Sinn HP, Geradts J, Diallo R, Poremba C, Herbst H **2001**. Ductal epithelial proliferations of the breast: a biological continuum? Comparative genomic hybridization and high-molecular-weight cytokeratin expression patterns. *J Pathol*, 195:415-421
23. Borradori L, Sonnenberg A **1996**. Hemidesmosomes: roles in adhesion, signaling and human diseases. *Curr Op Cell Biol*, 8:647-656
24. Bosman FT **1994**. The borderline: basement membranes and the transition from premalignant to malignant neoplasia. *Microscopy Res Technique*, 28:216-225
25. Boudreau N, Sympson CJ, Werb Z, Bissell MJ **1995**. Suppression of ICE and apoptosis in mammary epithelial cells by extracellular matrix. *Science*, 267:891-893
26. Burgeson RE, Chiquet M, Deutzmann R, Ekblom P, Engel J, Kleinmann R, Martin GR, Meneguzzi G, Paulsson M, Sanes J, Timpl R, Tryggvason K, Yamada Y, Yurchenco PD **1994**. A new nomenclature for the laminins. *Matrix Biol*, 14:209-211
27. Butkowski RJ, Wieslander J, Kleppel M, Michael AF, Fish AJ **1989**. Basement membrane collagen in the kidney: regional localization of novel chains related to collagen IV. *Kidney Int*, 35:1195



28. Cam Y, Caulet T, Bello G, Poulin G, Legros M, Pytlinska M **1984**. Immunohistochemical localization of macromolecules of the basement membrane and the peritumoral stroma in human laryngeal carcinomas. *J Pathol*, 144:35-44
29. Carter WG, Ryan MC, Gahr PJ **1991**. Epiligrin, a new cell adhesion ligand for integrin  $\alpha 3\beta 1$  in epithelial basement membranes. *Cell*, 65:599-610
30. Champlaud MF, Lunstrum GP, Rousselle P, Nishiyama T, Keene DR, Burgeson RE **1996**. Human amnion contains a novel laminin variant, laminin 7, which like laminin 6, covalently associates with laminin 5 to promote stable epithelial-stromal attachment. *J Cell Biol*, 132:1189-1198
31. Charpin C, Lissitzky CL, Jacquemier J, Lavaut MN, Kopp F, Pourreau-Schneider N, Martin PM, Toga M **1986**. Immunohistochemical detection of laminin in 98 human breast carcinomas: a light and electron microscopic study. *Hum Pathol*, 17:355-365
32. Cheng YS, Champlaud MF, Burgeson RE, Markinovich MP, Yurchenco PD **1997**. Self-assembly of laminin isoforms. *J Biol Chem*, 272:31525-31532
33. Colognato H, Yurchenco P **2000**. Form and functions: The laminin family of heterotrimers. *Dev Dyn*, 218:213-234
34. Damiani S, Ludvikova M, Tomsic G, Bianchi S, Gown, AM, Eusebi V **1999**. Myoepithelial cells and basal lamina in poorly differentiated in situ duct carcinoma of the breast - an immunocytochemical study. *Virchows Arch*, 434:227-234
35. Damjanov J **1990**. Heterogeneity of basement membranes in normal and pathologically altered tissues. *Virchows Arch*, 416:185-188
36. Damjanovich L, Fulop B, Adany R, Nemes Z **1997**. Integrin expression on normal and neoplastic human breast epithelium. *Acta Chir Hung*, 36:69-71

37. Darcy KM, Black JD, Hahm HA, Ip MM **1991**. Mammary organoids from immature virgin rats undergo ductal and alveolar morphogenesis when grown within a consituted basement membrane. *Exp Cell Res*, 196:49-65
38. Downer CS, Watt FM, Speight PM **1993**. Loss of  $\alpha 6$  and  $\beta 4$  integrin subunits coincides with loss of basement membrane components in oral squamous cell carcinomas. *J Pathol*, 171:183-190
39. Durham PL, Snyder JM **1995**. Characterization of  $\alpha 1$ ,  $\beta 1$  and  $\gamma 1$  laminin subunits during rabbit fetal lung development. *Dev Dynamics*, 203:408-421
40. Durkin ME, Loechel F, Mattei MG, Gilpin BJ, Albrechtsen R, Wewer UM **1997**. Tissue-specific expression of the human laminin  $\alpha 5$ -chain, an mapping of the gene to human chromosome 20q13.2-13.3 and to distal mouse chromosome 2 near the locus for the ragged(Ra) mutation.. *FEBS Lett*, 411:296-300
41. Ehrling K, Leivo J, Argraves WS, Rusholati E, Engvall E **1990**. Merosin, a tissue - sepecific basement membran protein, is a laminin - like protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87:3264-3268
42. Ekblom P **1993**. Basement membranes in development. Molecular and cellular aspects of basement membranes. *Academic Press, San Diego*, 0:359-378
43. Ekblom P **1996**. Receptors for laminins during epithelial morphogenesis. *Curr Opin Cell Biol*, 8:700-706
44. Ekblom P, Lonai P, Tslts JF **2003**. Expression and biological role of laminin-1. *Matrix Biol*, 22:35-47
45. Elston CW, Ellis IO **1998**. Tumours of the breast. *Fletcher Diagnostic histopathology of tumours. Churchill Livingstone, Edinburgh*:635-689
46. Engel J **1992**. Laminins and other strange proteins. *Biochem*, 31:10643-10651
47. Engel J **1989**. EGF-like domains in extracellular matrix proteins: localized signals for growth and differentiation? *FEBS lett*, 251:1-7

48. Engel J **1993**. Structure and function of laminin. Molecular and cellular aspects of basement membranes. *San Diego Academic Press*:147-176
49. Engvall E, Earwicker D, Haaparanta T, Ruoslahti F, Sanes JR **1990**. Distribution and isolation of four laminin variants: tissue restricted distribution of heterotrimers assembled from five different subunits. *Cell Regul*, 1:731-740
50. Engvall E, Davis GE, Dickerson K, Ruoslahti E, Varon S, Manthorpe M **1986**. Mapping of domains in human laminin using monoclonal antibodies: localisation of the neurite-promoting site. *J Cell Biol*, 103:2457-2465
51. Farnoud MR, Derome P, Peillon F, Li JY **1994**. Immunohistochemical localization of different laminin isoforms in human normal and adenomatous anterior pituitary. *Lab Invest*, 70:399-406
52. Flug M, Köpf-Maier P **1995**. The basement membrane and its involvement in carcinoma cell invasion. *Acta Anat*, 152:69-84
53. Galliano MF, Aberdam D, Aguzzi A, Ortonne JP, Meneguzzi G **1995**. Cloning and complete structure of the mouse laminin  $\alpha 3$ -chain. *J Biol Chem*, 270:21820-21826
54. Geberhiwot T, Ingerpuu S, Pedraza C, Neira M, Lehto U, Virtanen I, Kortersmaa J, Tryggvason K, Engvall E, Patarroyo M **1999**. Blood platelets contain and secrete laminin-8 ( $\alpha 4 \beta 1 \gamma 1$ ) and adhere to laminin-8 via  $\alpha 6 \beta 1$  integrin. *Exp Cell Res*, 253:723-732
55. Geberhiwot T, Ingerpuu S, Pedraza C, Neira M, Virtanen I, Tryggvason K, Patarroyo M **2000**. Erythromegakaryocytic cells synthesize laminin-8 ( $\alpha 4 \beta 1 \gamma 1$ ). *Exp Cell Res*, 254:189-195
56. Ghadially FN **1997**. Ultrastructural pathology of the cell and matrix. *Butterworth-Heinemann, Boston*, 2:1124-1133
57. Gould VE, Koukoulis GK, Virtanen I **1990**. Extracellular matrix proteins and their receptors in the normal, hyperplastic and neoplastic breast. *Cell Diff and Development*, 32:409-416
58. Green KJ, Jones JC **1996**. Desmosomes and hemidesmosomes: structure and function of molecular components. *Faseb J*, 10:871-881

- 
59. Guelstein VI, Tchypysheva TA, Ermilova VD, Ljubimov AV **1993**. Myoepithelial and basement membrane antigens in benign and malignant human breast tumors. *Int J Cancer*, 53:269-277
  60. Gui GPH, Puddefoot JR, Vinson GP, Wells CA, Carpenter R **1997**. Altered cell-matrix contact: a prerequisite for breast cancer metastasis? *Br J Cancer*, 75:623-633
  61. Gusterson BA, Warburton MJ, Mitchell D, Ellison N, Munro-Neville A, Rudland PS **1982**. Distribution of myoepithelial cells and basement membrane proteins in the normal breast and in benign and malignant breast disease. *Cancer Res*, 42:4763-4770
  62. Gustmann C, Altmannsberger M, Osborn M, Griesser H, Feller AC **1991**. Cytokeratin expression and vimentin content in large cell anaplastic lymphomas and other non-Hodgkin's lymphomas. *Am J Pathol*, 138:1413-1422
  63. Haas KM, Berndt A, Stiller KJ, Hyckel P, Kosmehl H **2001**. A Comparative Quantitative Analysis of Laminin-5 in the Basement Membrane of Normal, Hyperplastic, and Malignant Oral Mucosa by Confocal Immunofluorescence Imaging. *J Histochem Cytochem*, 49:1261-1268
  64. Hao J, Yang Y, McDaniel KM, Dalkin BL, Cress AE, Nagle RB **1996**. Differential expression of laminin-5 by human malignant and normal prostate. *Am J Pathol*, 149:1341-1349
  65. Havenith MG, Arends JW, Simon R, Volovics A, Wiggers T, Bosman FT **1988**. Type IV collagen immunoreactivity in colorectal cancer. Prognostic value of basement membrane deposition. *Cancer*, 62:2207-2211
  66. Henderson DJ, Copp AJ **1997**. Role of the extracellular matrix in neural crest cell migration. *J Anat*, 191:507-515
  67. Henning K, Berndt A, Katenkamp D, Kosmehl H **1999**. Loss of laminin-5 in the epithelium-stroma interface: an immunohistochemical marker of malignancy in epithelial lesions of the breast. *Histopathol*, 34:305-309
-

68. Hewitt H, Powe DG, Morrell K, Balley E, Leach ICH, Ellis IO, Turner DR **1997**. Laminin and collagen IV subunit distribution in normal and neoplastic tissues of colorectum and breast. *Br J Cancer*, 75:221-229
69. Holland R, Peterse JL, Millis RR, Eusebi V, Faverly D, van de Vijver MJ, Zafrani B **1994**. Ductal carcinoma in situ: a proposal for new classification. *Semin Diagn Pathol*, 11:167-180
70. Hori H, Kanamori T, Mizuta T, Yamaguchi N, Liu Y, Nagai Y **1994**. Human laminin M chain: epitope analysis of ist monoclonal antibodies by immunoscreening of cDNA clones and tissue expression. *J Biochem*, 116:1212-1219
71. Hsi B-L, Yeh C-JG **1986**. Monoclonal antibodies to human amnion. *J Reprod Immunol*, 9:11-21
72. Hudson BG, Reeders ST, Tryggvason K **1993**. Type IV collagen: structure, gene organization and role in human disease. *J Biol Chem*, 268:26033-26036
73. Hunter DD, Shah V, Merlie JP, Sanes JR **1989**. A laminin-like adhesive protein concentrated in the synaptic cleft of the neuromuscular junction. *Nature*, 338:229-234
74. Inoue S **1994**. Basic structure of basement membranes is a fine network of "cords", irregular anastomosing strands. *Mic Res Techn*, 28:29-47
75. Inoue S, Leblond CP **1988**. Three-dimensional network of cords: the main component of basement membranes. *Am J Anat*, 181:341-358
76. Ivanainen A, Vuolteenaho R, Sainio K, Eddy R, Shows TB, Sariola H, Tryggvason K **1994**. The human laminin  $\beta$ 2chain (s-laminin): stucture, expression in fetal tissues and chromosomal assignment of the LAMB2 gene. *Matrix Biol*, 14:489-497
77. Ivanainen A, Sainio K, Sariola H, Trygvason K **1995**. Primary structure and expression of a novel human laminin  $\alpha$ 4 chain. *FEBS Lett*, 365:183-188

78. Kainulainen T, Autio-Harmainen H, Oikarinen A, Salo S, Tryggvasson K, Salo T **1997**. Altered distribution and synthesis of laminin-5 (kalinin) in oral lichen planus, epithelial dysplasias and squamous cell carcinomas. *Br J Dermatol*, 136:331-336
79. Kallunki P, Sainio K, Eddy R, Byers M, Kallunki T, Sariola H, Beck K, Hirvonen H, Shows TB, Tryggvason K **1992**. A truncated chain homologous to the B2-chain: structure, spatial expression and chromosomal assignment. *J Cell Biol*, 119:679-693
80. Kikkawa Y, Sanzen N, Sekiguchi K **1998**. Isolation and characterization of laminin 10/11 secreted by human lung carcinoma cells. *J Biol Chem*, 273:15854-15859
81. Kivirikko S, McGrath JA, Baudoin C **1995**. A homozygous nonsense mutation in the  $\alpha 3$  chain gene of laminin 5 (LAMA3) in lethal (Herlitz) junctional epidermolysis bullosa. *Hum Mol Genet*, 4:959-962
82. Koch M, Olson P F, Albus A, Jin W, Hunter DD, Brunken WJ, Burgeson RE, Champlaud MF **1999**. Characterization and expression of the laminin  $\gamma 3$  chain: A novel, non-basement membrane associated, laminin chain. *J Cell Biol*, 145:605-617
83. Kohlberger P, Beneder Ch, Horvat R **2003**. Immunohistochemical expression of laminin-5 in cervical intraepithelial neoplasia. *Gynecol Oncol*, 89:391-394
84. Köpf-Maier P, Merker HJ **1991**. Development of the basal lamina in xenografted human carcinomas: An ultrastructural and immunohistochemical study. *Cell Tiss Res*, 266:563-578
85. Koshikawa N, Moriyama K, Takamura H, Mizushima H, Nagashima Y, Yanoma S, Miyazaki K **1999**. Overexpression of laminin  $\gamma 2$  chain monomer in invading gastric carcinoma cells. *Cancer Res*, 59:5596-5601
86. Kosmehl H, Berndt A, Katenkamp D **1996**. Molecular variants of fibronectin and laminin: structure, physiological occurrence and histopathological aspects. *Virchows Arch*, 429:311-322

87. Kosmehl H, Berndt A, Katenkamp D, Hyckel P, Stiller KJ, Gabler U, Langbein L, Reh T **1995**. Integrin receptors and their relationship to cellular proliferation and differentiation of oral squamous cell carcinoma. A quantitative immunohistochemical study. *J Oral Pathol Med*, 24:343-348
88. Kosmehl H, Berndt A, Strassburger S, Borsi L, Rouselle P, Mandel U, Hyckel P, Zardi L, Katenkamp D **1999**. Distribution of laminin and fibronectin isoforms in oral muosa and oral squamous cell carcinoma. *B J Cancer*, 81:1071-1079
89. Lefebvre O, Wolf C, Limacher JM, Hutin P, Wendling C, LeMeur M, Basset P, Rio MC **1992**. The breast cancer-associated stromelysin-3 gene is expressed during mouse mammary gland apoptosis. *Cell Biol*, 119:997-1002
90. Leivo I, Engvall E **1988**. Merosin, a protein specific for basement membrane of Schwann cells, striated muscle and trophoblast, is expressed late in nerve and muscle development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85:1544-1548
91. Liotta LA **1984**. Tumor invasion and metastasis: role of basement membrane. *Am J Pathol*, 117:339-348
92. Liotta LA, Rao CN, Barsky SH **1983**. Tumor invasion and the extracellular matrix. *Lab Invest*, 49:636-649
93. Lochter A, Bissell MJ **1995**. Involvement of extracellular matrix constituents in breast cancer. *Cancer Biol*, 6:165-173
94. Lohi J, Oivula J, Kivilaakso E, Kiviluoto T, Fröjdman K, Yamada Y, Burgeson RE, Leivo I, Virtanen I **2000**. Basement membrane laminin-5 is deposited in colorectal adenomas and carcinomas and serves as a ligand for  $\alpha 3 \beta 1$  integrin. *APMIS*, 108:161-172
95. Lohi J, Leivo I, Owaribe K, Burgeson RE, Fransilla K, Virtanen I **1998**. Neoexpression of the epithelial adhesion complex antigens in thyroid tumours is associated with proliferation and squamous differentiation markers. *J Pathol*, 184:191-196

96. Määttä M, Virtanen I, Burgeson R, Autio-Harmainen H **2001**. Comparative Analysis of Distribution of Laminin Chains in the Basement Membranes in Some Malignant Epithelial Tumors: The  $\alpha 1$  Chain of Laminin Shows a Selected Expression Pattern in Human Carcinomas. *J Histochem Cytochem*, 49:711-725
97. Määttä M, Soini Y, Pääkkö P, Salo S, Tryggvason K, Autio-Harmainen H **1999**. Expression of the laminin  $\gamma 2$  chain in different histological types of lung carcinoma. A study by immunohistochemistry and in situ hybridization. *J Pathol*, 188:361-368
98. Mark von der K, Kühl U **1985**. Laminin and its receptors. *Biochimica et Biophysica Acta*, 823:147-160
99. Markinovich MP, Lunstrum GP, Keene DR, Burgeson RE **1992**. The dermal-epidermal junction of human skin contains a novel laminin variant. *J Cell Biol*, 119:695-703
100. Markinovich MP, Verrando P, Keene DR, Burgeson RE, **1993**. Basement membrane proteins kalinin and nicein are structurally and immunologically identical. *Lab Invest*, 69:295-299
101. Markinovich MP, Lunstrum GP, Burgeson RE, **1992**. The anchoring filament protein kalinin is synthesized and secreted as a high molecular weight precursor. *J Biol Chem*, 267:17900-17906
102. Martin H G **1987**. Laminin and other basement membrane components. *Ann Rev Cell Biol*, 3:57-85
103. Martin PT, Ettinger AJ, Sanes JR **1995**. A synaptic localization domain in the synaptic cleft protein laminin  $\beta 2$  (s-laminin). *Science*, 269:413-416
104. Martinez-Hernandez A, Amenta PS **1983**. The basement membrane in pathology. *Lab Invest*, 48:656-680
105. Matsui C, Hoeffler WK, Nelson CF, Hernandez GT, Herron GS, Bauer EA **1995**.  $\gamma 2$  chain of laminin- 5 is recognized by monoclonal antibody GB3. *J Invest Dermatol*, 105:648-652
106. Merker H.J. **1994**. Morphology of basement membrane. *Microsc Res and Techn*, 28:95-124



107. Miner JH, Patton BL, Lentz SI, Gilbert DJ, Snider WD, Jenkins A, Copeland NG, Sanes JR **1997**. The  $\alpha$ -laminin chains: expression, developmental transitions, chromosomal locations of  $\alpha$  1-5, identification of heterotrimeric laminins 8-11, and cloning of a novel  $\alpha$ -3 isoform. *J Cell Biol*, 137:685-701
108. Miner JH, Lewis RM, Sanes JR **1995**. Molecular cloning of a novel laminin chain,  $\alpha$ -5, and widespread expression in adult mouse tissues. *J Biol Chem*, 270:28523-28526
109. Mizushima H, Koshikawa N, Moriyama K, Takamura H, Nagashima Y, Hirahara F, Miyazaki K **1998**. Wide distribution of laminin-5  $\gamma$ 2-chain in basement membranes of various human tissues. *Horm Res*, 50:27-30
110. Moll, R., Moll, I. **1998**. Epidermal adhesion molecules and basement membrane components as target structures of autoimmunity. *Virchows Arch*, 432:487-504
111. Nagle RB, Hao J, Knox JD, Dalkin BL, Clark V, Cress AE **1995**. Expression of hemidesmosomal and extracellular matrix proteins by normal and malignant human prostate tissue. *Am J Pathol*, 146:1498-1507
112. Nerlich A **1998**. Wert der Basalmembrandarstellung in der Diagnostik invasiver Karzinome. *Pathologe*, 19:89-94
113. Nerlich A. **1995**. Morphologie von Basalmembran und assoziierten Matrixproteinen in normalem und pathologischen Gewebe. *Gustav-Fischer-Verlag*:26-47
114. Niessen CM, Hogervorst F, Jaspars AA, Melker DE, Delwel EHM, Hulsman EHM, Kuikman J, Sonnenberg A **1994**. The  $\alpha$ 6 $\beta$ 4 integrin is a receptor for both laminin and kalinin. *Exp Cell Res*, 211:360-367
115. Nievers MG, Schaapveld RQJ, Sonnenberg A **1999**. Biology and function of hemidesmosomes. *Matrix Biol*, 18:5-17
116. Noel A, Fontes R, Emonard H, Foidart JM **1993**. Extensive deposition of basement membrane by tumours: a prognostic factor? A reappraisal. *Epith Cell Biol*, 2:150-154

117. Parry G, Lee EY, Farson D **1985**. Collagenous substrata regulate the nature and distribution of glycosaminoglycans produced by differentiated cultures of mouse mammary epithelial cells. *Exp Cell Res*, 156:487-499
118. Paulson M, Saladin K **1989**. Mouse heart laminin. Purification of the native protein and structural comparison with Engelbreth- Holm-Swarm tumor laminin. *J Biol Chem*, 264:18726-18732
119. Paulsson M **1993**. Laminin and collagen IV variants and heterogeneity in basement membrane composition. *Mol and cell aspects of basement membr*, 0:177-187
120. Paulsson M **1992**. Basement membrane proteins: Structure, assembly and cellular interactions. *Crit Rev Biochem Molec Biol*, 27:93-127
121. Pegoraro E, Marks H, Garcia CA **1998**. Laminin  $\alpha 2$  muscular dystrophy: genotype/phenotype studies of 22 patients. *Neurology*, 51:101-110
122. Petersen OW, Ronnov - Jessen L, Howlett AR, Bissell MJ **1992**. Interaction with basement membrane serves to rapidly distinguish growth and differentiation pattern of normal and malignant human breast epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 89:9064-9068
123. Pulkkinen L, Christiano AM, Airenne T, Haakana H, Tryggvason K, Uitto J **1994**. Mutations in the  $\gamma 2$ -chain gene (LAMC2) of kalinin/laminin5 in the junctional forms of epidermolysis bullosa. *Nature Genet.*, 6:293-298
124. Pulkkinen L, Gerecke DR, Christiano AM, Wagman DW, Burgeon RE, Uitto J **1995**. Cloning of the  $\beta 3$ -chain gene (LAMB3) of human laminin-5, a candidate gene in junctional epidermolysis bullosa. *Genomics*, 25:192-198
125. Pyke C, Salo S, Ralfkiär E, Romer J, Dano K, Tryggvason K **1995**. Laminin-5 is marker of invading cancer cells in some human carcinomas and is coexpressed with the receptor for urokinase plasminogen activator in budding cancer cells in colon adenocarcinomas. *Cancer Res*, 55:4132-4139

126. Pyke C, Romer J, Kallunki P, Lund LR, Ralfikär E, Dano K, Tryggvason K **1994**. The  $\gamma 2$ -chain of kalinin/ laminin 5 is preferentially expressed in invading malignant cells in human cancers. *Am J Pathol*, 145:782-791
127. Roos E **1984**. Cellular adhesion, invasion and metastasis. *Biochem Biophys Acta*, 738:263-284
128. Rousselle P, Aumailley M **1994**. Kalinin is more efficient than laminin in promoting adhesion of primary keratinocytes and some other epithelial cells and has a different requirement for integrin receptors. *J Cell Biol*, 125:205-214
129. Rousselle P, Lunstrum GP, Keene DR, Burgeson RE **1991**. Kalinin: An epithelium specific basement membrane adhesion molecule that is a component of anchoring filaments. *J Cell Biol*, 114:567-576
130. Sakr WA, Zarbo RJ, Crissman JD **1988**. Immunohistologic distribution of basement membrane in breast neoplasia. *Surg Pathol*, 1:3-12
131. Sanes JR, Engvall E, Butkowski R, Hunter DD **1990**. Molecular heterogeneity of basal laminae: isoforms of laminin and collagen IV at the neuromuscular junction and elsewhere. *J Cell Biol*, 111:1685-1699
132. Sasaki M, Kleinman HK, Huber H, Deutzman R, Yamada Y **1988**. Laminin, a multidomain protein: the A chain has a unique globular domain and homology with the basement membrane proteoglycan and the laminin B chains. *J Biol Chem*, 263:16536-16544
133. Schapers RF, Pauwels RP, Havenith MG **1990**. Prognostic significance of type IV collagen and laminin immunoreactivity in urothelial carcinomas of the bladder. *Cancer*, 66:2533-2538
134. Sinn HP, Kellerhoff NM, Kellerhoff R, Bastert G, Otto HF **1997**. Subtypisierung und Prognoseabschätzung beim invasiven lobulären Karzinom. *Pathologe*, 18:37-44
135. Soini Y, Määttä M, Salo S, Tryggvasson K, Autio- Harmainen **1996**. Expression of the laminin  $\gamma 2$ -chain in pancreatic adenocarcinoma. *J Pathol*, 180:290-294

136. Sollberg S, Peltonen J, Uitto J **1992**. Differential expression of laminin isoforms and  $\beta 4$  integrins epitopes in the basement membrane of normal human skin and basal cell carcinomas. *J Invest Dermat*, 98:864-870
137. Sordat I, Bosman FT, Dorta G, Rousselle P, Aberdam D, Blum AL, Sordat B **1998**. Differential expression of laminin-5 subunits and integrin receptors in human colorectal neoplasia. *J Pathol*, 185:44-52
138. Sorokin LM, Pausch F, Durbeej M, Ekblom P **1997**. Differential expression of five laminin  $\alpha(1-5)$ -chains in developing and adult mouse kidney. *Dev Dyn*, 210:446-462
139. Spinardi L, Einheber S, Cullen T, Milner Ta, Giancotti FG **1995**. A recombinant tail-less integrin  $\beta 4$  subunit disrupts hemidesmosomes, but does not suppress  $\alpha 6 \beta 4$ -mediated cell adhesion to laminins. *J Cell Biol*, 129:473-487
140. Stahl S, Weitzman S, Jones JCR **1997**. The role of laminin-5 and its receptors in mammary epithelial cell branching morphogenesis. *J Cell Sci*, 110:55-63
141. Stetler-Stevenson WG **1996**. Dynamics of matrix turnover during pathologic remodeling of the extracellular matrix. *Am J Pathol*, 148:1345-1349
142. Stetler-Stevenson WG, Aznavoorian S, Liotta LA **1993**. Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. *Ann Rev Cell Biol*, 9:541-573
143. Strassburger S, Berndt A, Hyckel P, Katenkamp D, Kosmehl H **1998**. Differential expression of laminin chains in the human major salivary gland. *Histochem J*, 30:81-88
144. Streuli CH, Bissell MJ **1990**. Expression of extracellular matrix components is regulated by substratum. *J Cell Biol*, 110:1405-1415
145. Streuli CH, Bailey N, Bissell MJ **1991**. Control of mammary epithelial differentiation: basement membrane induces tissue specific gene expression in the absence of cell-cell interaction and morphological polarity. *J Cell Biol*, 115:1383-1395

146. Talhouk RS, Bissell MJ, Werb Z **1992**. Coordinated expression of extracellular matrix-degrading proteinases and their inhibitors regulates mammary epithelial function during involution. *J Cell Biol*, 118:1271-1282
147. Tani T, Lumme A, Linnala A, Kivilaakso E, Kiviluoto T, Burgeson RE, Kangas L, Leivo I, Virtanen I **1997**. Pancreatic carcinomas deposit laminin-5, preferably adhere to laminin-5, and migrate on the newly deposited basement membrane. *Am J Pathol*, 151:1289-1302
148. Tavassoli FA, Devilee P **2003**. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs. *IARC Press*:10-112
149. Ten Velde GPM, Havenith MG, Volovics A, Bosman MD **1991**. Prognostic significance of basement membrane deposition in operable squamous cell carcinomas of the lung. *Cancer*, 67:3001-3005
150. Thomasset N., Lochter A., Sympton CJ., Lund LR., Williams DR., Behrendtsen O., Werb Z., Bissell MJ. **1998**. Expression of autoactivated stromelysin-1 in mammary glands of transgenic mice leads to a reactive stroma during early development. *Am. J. Pathol.*, 153:457-67
151. Tiger CF, Champlaud MF, Petrosa-Domellof F, Thornell LE, Ekblom P, Gullberg D **1997**. Presence of laminin  $\alpha$ 5-chain and lack of laminin  $\alpha$ 1-chain during human muscle development and in muscular dystrophies. *J Biol Chem*, 272:28590-28595
152. Timpl R **1989**. Structure and biological activity of basement membrane proteins. *Eur J Biochem*, 180:487-502
153. Timpl R, Dziadek M **1986**. Structure, development and molecular pathology of basement membranes. *Int Rev Exp Pathol*, 29:1-112
154. Timpl R, Rohde H, Robey PG, Rennard SI, Foidatt JM, Martin GR **1979**. Laminin - a glycoprotein from basement membranes. *J Biol Chem*, 254:9933-9937
155. Timpl R, Brown JC **1994**. The laminins. *Matrix Biol*, 14:275-281

156. Verrando P, Hsi BL, Yeh CJ, Pisani A, Serieys N, Ortonne J **1987**. Monoclonal antibody GB3, a new probe for the study of human basement membranes and hemidesmosomes. *Exp Cell Res*, 170:116-128
157. Virtanen I, Tani T, Bäck N, Häppölä O, Laitinen L, Kiviluoto T, Salo J, Burgeson RE, Lekto VP, Kivilaakso E **1995**. Differential expression of laminin chains and their integrin receptors in human gastric mucosa. *Am J Pathol*, 147:1123-1132
158. Virtanen I, Gullberg D, Rissanen J, Kivilaakso E, Kiviluoto T, Laitinen A, Lehto VP, Ekblom P **2000**. Laminin  $\alpha$ 1-chain shows a restricted distribution in epithelial basement membranes of fetal and adult human tissues. *Exp Cell Res*, 257:298-309
159. Virtanen J, Laitinen L, Korhonen M **1995**. Differential expression of laminin polypeptides in developing and adult human kidney. *J Histochem and Cytochem*, 43:621-628
160. Vogel W, Kranz L, Brugger W, Berndt A, Kosmehl H **1999**. Expression of laminin  $\beta$ 2-chain in normal human bone marrow. *Blood*, 94:1143-1145
161. Vuolteenaho R, Nissinen M, Sainio K, Byers M, Eddy R, Hirvonen H, Shows TB, Sariola E, Engvall E, Tryggvason K **1994**. Human laminin M chain (merosin): Complete primary structure, chromosomal assignment, and expression of the M and A chain in human fetal tissue. *J Cell Biol*, 124:381-394
162. Werb Z, Ashkenas J, MacAuley A, Wiesen JF **1996**. Extracellular matrix remodeling as a regulator of stromal-epithelial interactions during mammary gland development, involution and carcinogenesis. *Braz J Med Biol Res*, 29:1087-97
163. Wetzels RHW, Holland R, Urbain JGM, van Haelst E, Lane B, Leigh IM, Ramaerker FCS **1989**. Detection of basement membrane components and basal cell keratin 14 in noninvasive and invasive carcinomas of the breast. *Am J Pathol*, 134:571-579

164. Wewer UM, Wayner EA, Hoffstrom BG, Lan F, Meyer-Nielsen B, Engvall E, Albrechtsen R **1994**. Selective assembly of laminin variants by human carcinoma cells. *Lab Invest*, 71:719-730
165. Wewer UM, Gerecke DR, Durkin ME, Kurtz KS, Mattei MG, Champlaud MF, Burgeson RE, Albrechtsen R **1994**. Human  $\beta 2$  chain of laminin ( formerly s-chain ): DNA cloning, chromosomal localization and expression in carcinomas. *Genomics*, 24:243-252
166. Wewer UM, Albrechtsen R, Manthorpe M, Varon S, Engvall E, Ruoslahti E **1983**. Human laminin isolated in a nearly intact, biologically active form from placenta by limited proteolysis. *J Biol Chem*, 258:12654-12660
167. Wicha MM **1980**. Effects of inhibition of basement membrane collagen deposition on rat mammary gland development. *Dev Biol*, 80:253-266
168. Wicha MS, Lowrie G, Kohn E **1982**. Extracellular matrix promotes mammary epithelial growth and differentiation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 79:3213-3217
169. Willebrand D, Bosman FF, De Goeij AFPM **1986**. Patterns of basement membrane deposition in benign and malignant breast tumors. *Histopathology*, 10:1231-1291
170. Wittekind C, Klimpfinger M, Sobin LH **2004**. TNM-Atlas Illustrierter Leitfaden zur TNM/pTNM-Klassifikation maligner Tumoren. , 5:210-223
171. Yeh CJG, Hsi BL, Ettore F **1986**. Normal epithelial antigens recognised by GB3 and GB5 are diminished in intraductal and lost in infiltrating human breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat*, 8:117-123
172. Yurchenco PD, Schnittny JC **1990**. Molecular architecture of basement membranes. *FASEB*, 4:1577-1590
173. Yurchenco PD, O'Rear JJ **1994**. Basal lamina assembly. *Curr Opin Cell Biol*, 6:674-681

### Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Herr Prof. Dr. med. habil. H. Kosmehl, Herr Prof. Dr. med. habil. D. Katenkamp, Herr PD Dr. rer. nat. habil. A. Bernd und Herr O. Fuksik,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den 04. Februar 2005

---

Dipl. Med. Kerstin Henning

---



## Lebenslauf

Name Kerstin Henning  
Geburtsdatum 31. Mai 1966

### Ausbildung:

1972 - 1976 Grundschule Langenorla  
1976 - 1980 Polytechnische Oberschule Pößneck  
1980 - 1984 Gymnasium Pößneck  
1984 - 1985 praktisches Jahr Agricola Krankenhaus Saalfeld  
1985 - 1991 Studium der Medizin Friedrich Schiller Universität Jena

### Abschluss:

1984 Abitur  
1991 Hochschulabschluss in der Studienrichtung Medizin und  
Diplom Mediziner, Friedrich Schiller Universität Jena  
2003 Anerkennung als Facharzt für Pathologie

### berufliche Tätigkeit:

01.09.1991 - 31.12.1992 Arzt im Praktikum Abteilung für Gynäkologie  
und Geburtshilfe im Kreiskrankenhaus Pößneck  
01.01.1993 - 31.08.1993 Arzt im Praktikum Institut für Pathologie  
der Friedrich Schiller Universität Jena  
01.09.1993 – 23.06.2003 Assistenzarzt und wissenschaftlicher  
Mitarbeiter Institut für Pathologie  
der Friedrich Schiller Universität Jena  
24.06.2003 - 31.07.2004 Facharzt für Pathologie, Institut für Pathologie  
der Friedrich Schiller Universität Jena  
seit 01.08.2004 Oberärztin für Pathologie, Institut für Pathologie  
des Klinikum Brandenburg GmbH

Jena, den 04. Februar 2005

---

Dipl. Med. Kerstin Henning

---

## Veröffentlichungen, Poster und Vorträge

Henning K, 1995. Variation der Lamininkettenexpression in benignen und malignen Läsionen der Mamma. Deutsche Gesellschaft für Pathologie. Poster. 175

Eidner T, Schleier P, Henning K, Neumann T, Hein G, 1997. Unterkiefertumor als Manifestation eines primären Hyperparathyreoidismus. Fallvorstellung

Henning K, Katenkamp D, 1998. The myofibroblast is a preferential source of the oncofetal ED-B + fibronectin in carcinoma and fibromatosis. An RNA/RNA ISH study. International Academy of Pathology. Poster 241

Henning K, Berndt A, Katenkamp D, Kosmehl H, 1999. Loss of laminin-5 in the epithelium-stroma interface: an immunohistochemical marker of malignancy in epithelial lesions of breast. Histopathology, 34:305-309

Henning K, Berndt A, Helfritzsch H, Katenkamp D, Kosmehl H, 1999. Primärer primitiver neuroektodermaler Tumor der Lunge. Fallbericht mit histologischer, immunhistochemischer und elektronenmikroskopischer Untersuchung. Deutsche Gesellschaft für Pathologie. Poster. 85

Henning K, Kühne-Heid R, Pfeiffer R, Patt S, Raabe G, Katenkamp D, 1999. Bakterielle Myositis bei schwerer Staphylococcus aureus-Septikämie. Fallbericht. Deutsche Gesellschaft für Pathologie. Poster. 220

Gottschalk P, Masri-Záda R, Werner B, Henning K, Bosseckert H, 2000 Pneumatosis cystoides intestinalis - Falldarstellung und Überblick über Epidemiologie, Ätiopathogenese, Diagnostik und Therapie. Leber Magen Darm 30:24-33

Henning K, Berndt A, Katenkamp D, Kosmehl H, 2000. Der Laminin alpha2-Kettenverlust ist ein besserer Indikator für Malignität in duktalem Läsionen der Mamma als die Myoepithelzellverminderung. Deutsche Gesellschaft für Pathologie. Poster Gynäkologische Pathologie. 241

Henning K, Berndt A, 2003. Histologische Klassifikation des Mammakarzinoms. Tumorzentrum Jena. Vortrag zum Fortbildungscurriculum Mammakarzinom

Henning K, 2004. Der Beitrag von Laminin 5 zur Klassifikation tumoröser Läsionen der Mamma. Klinikum Erfurt und Roche. Vortrag zur HER2-Diagnostik.

Henning K, 2004. Darstellung verschiedener CIN-Läsionen. Vortrag zum VI. Jenaer Kolposkopiekurs.

Henning K, 2004. Fallvorstellung zur fibrosierenden Variante der Hashimoto-Thyreoiditis. 64. Berliner Histologisches Kolloquium.

---

### Danksagung

Mein aufrichtiger Dank gilt all jenen, die mir ihre Zeit gewidmet, Ideen beigetragen und mich ermutigt haben:

Herrn Prof. Dr. med. habil. H. Kosmehl danke ich für die Vergabe des interessanten Themas.

Herrn Prof. Dr. med. habil. H. Kosmehl, Herrn Prof. Dr. med. habil. D. Katenkamp und Herrn O. Fuksik möchte ich an dieser Stelle außerdem für die kritische Durchsicht meiner Arbeit und die daraus resultierenden wertvollen Hinweise zu deren Gelingen danken. Ihre Anregungen und ihre Gesprächsbereitschaft waren mir für die Umsetzung der Arbeit eine wertvolle Hilfe.

Herrn PD Dr. rer. nat. habil. A. Berndt gilt mein Dank für sein stetes Interesse an meiner Arbeit und für seine fachliche Unterstützung.

Für die aufwendige technische Bearbeitung und die Immunmarkierung des Gewebematerials möchte ich mich besonders bei Frau Christiane Geier bedanken.

Mein Dank gilt weiterhin Herrn Otto Fuksik, der mich bei allen Fragen und Problemen der gestalterischen Umsetzung der Untersuchungsergebnisse unterstützt hat sowie für seine aufmunternden Worte bei kleineren Rückschlägen.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern für die fortdauernde Unterstützung während der Promotionszeit herzlich danken.

Jena, den 04. Februar 2005

---

Dipl. Med. Kerstin Henning

---